

**Rolle des HER2/neu-Rezeptors (erbB2) bei der
Entstehung der Restenose nach Trauma der
Arteria femoralis der Maus**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des
Fachbereichs Medizin
der
Justus-Liebig-Universität
Gießen

Vorgelegt von
Schneeweis, Christopher
aus
Münster
Gießen, 2006

**Aus der Medizinischen Klinik des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg,
Standort Gießen
Innere Medizin I, Abteilung für Kardiologie /
Angiologie
Ärztl. Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns**

Gutachter: PD Dr. med. R. Braun-Dullaeus

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Tag der Disputation: 30.03.2007

Meinen Eltern

Jutta Schneeweis-Schröer und

Raymund Schneeweis

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 6 |
| 1.1 Grundlagen der Arteriosklerose und Restenose | 7 |
| 1.2 Therapiemöglichkeiten | 9 |
| 1.3 Die Bedeutung des HER2/neu (erbB2) Proto-Onkogens | 12 |
| 2. FRAGESTELLUNG | 15 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| 3.1 Geräte und verwendete Software | 16 |
| 3.2 Chemikalien | 16 |
| 3.3 Medikamente | 17 |
| 3.4 Chirurgische Instrumente und Operationsmaterialien | 17 |
| 3.5 Antikörper | 19 |
| 3.6 Weitere Materialien / Verwendete Mäuse | 20 |
| 3.7 Operation der Maus | 20 |
| 3.7.1 Vorbereitung der Narkose | 20 |
| 3.7.2 Vorbereitung der Operation | 20 |
| 3.7.3 Narkose | 21 |
| 3.7.4 Operation | 21 |
| 3.8 Entnahme der Arteria femoralis | 27 |
| 3.9 Anfertigung der histologischen Schnitte | 27 |
| 3.10 Morphometrie | 28 |
| 3.11 Fluoreszenz-Immunhistochemie zum Nachweis des HER2/neu-Rezeptors und α -Aktin | 28 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.12 | Bewertung der Fluoreszenz-Immunhistochemie _____ | 29 |
| 3.13 | Statistische Auswertung _____ | 30 |
| 4. | ERGEBNISSE _____ | 31 |
| 4.1 | Traumainduzierte neointimale Proliferation nach Dilatation _____ | 31 |
| 4.2 | Nachweis glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) in der Neointima ____ | 35 |
| 4.3 | HER2/neu Rezeptor-Expression in dilatierten Gefäßen _____ | 37 |
| 4.4 | HER2/neu Rezeptor-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen _____ | 43 |
| 5. | DISKUSSION _____ | 49 |
| 5.1 | Bedeutung der traumainduzierten neointimalen Proliferation _____ | 50 |
| 5.2 | Bedeutung des HER2/neu-Rezeptors an der Neointima-Proliferation _____ | 51 |
| 5.3 | Mögliche Bedeutung der HER2/neu-Expression in der Media _____ | 52 |
| 5.4 | Denkbare therapeutische Ansätze und mögliche Konsequenzen _____ | 53 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG _____ | 54 |
| 6.1 | Deutsche Version _____ | 54 |
| 6.2 | Englische Version (Summary) _____ | 55 |
| 7. | LITERATUR _____ | 56 |
| 8. | LEBENS LAUF _____ | 64 |
| 9. | DANKSAGUNG _____ | 66 |

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen nehmen einen sehr bedeutenden Stellenwert in der medizinischen Versorgung ein. Laut Statistik der World Health Organisation (WHO) ¹ sterben weltweit jährlich etwa 14 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In den modernen Industriegesellschaften stehen kardiovaskuläre Erkrankungen somit in der Sterbestatistik an erster Stelle der Todesursachen.

Viele dieser Erkrankungen lassen sich auf eine über Jahrzehnte entstandene Arteriosklerose zurückführen, denn inzwischen steht fest, dass diese nicht erst eine Erkrankung des hohen Erwachsenenalters ist, sondern, dass deren Grundlagen schon in früher Jugend gelegt werden ^{2, 3}. Schon im fetalen Alter können bereits erste Gefäßveränderungen vorhanden sein.

Die therapeutischen Maßnahmen beschränken sich gegenwärtig auf medikamentöse Therapien und invasiv revaskularisierende Maßnahmen. Doch diese therapeutischen Vorgänge vermögen nur symptomatische Folgen zu beheben, und sind häufig in ihren Ergebnissen unbefriedigend. So ist beispielsweise die kardiologische Methode der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) häufig durch eine nach Monaten eintretende erneute Stenosierung ^{4, 5} des Gefäßes limitiert. Auch die Implantation von Stents wird in vielen Fällen von einer hohen Zahl an erneut auftretenden Beschwerden durch Restenosierungsprozesse begleitet. Als neueste Therapiemaßnahmen werden medikamentös beschichtete Stents in die stenosierten Bereiche eingesetzt, um die Zellproliferation glatter Gefäßmuskelzellen, welche die Restenose bedingen, zu hemmen ⁶.

1.1 Grundlagen der Arteriosklerose und Restenose

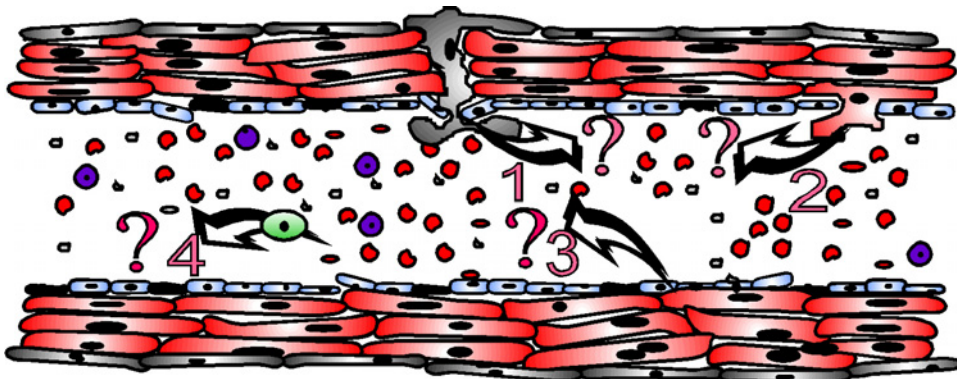
Die Entstehung einer Arteriosklerose ist ein multifaktorieller Prozess, an dem vielfältige pathogenetische Mechanismen beteiligt sind. Zum einen basiert die Genese der Arteriosklerose auf beeinflussbaren Größen, wie zum Beispiel Dyslipoproteinämie und Bewegungsmangel, zum anderen auf unbeeinflussbaren Größen, wie familiärer Disposition, männlichem Geschlecht und Lebensalter ⁷. Darüber hinaus existieren unterschiedlichste Theorien über die pathogenetischen Mechanismen, die zur Entstehung einer Arteriosklerose führen.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren (LDL-Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus) schädigen das Gefäßendothel und führen so zu einer endothelialen Dysfunktion, in deren Rahmen es zur Rekrutierung von Leukozyten und zur Entwicklung eines inflammatorischen Geschehen in der Gefäßwand kommt. Neuere Studien haben die Rolle von Entzündungsprozessen für die Pathogenese der Arteriosklerose belegt ⁸.

Im Zusammenhang mit dem entzündlichen Geschehen stellt die Immigration und die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells; VSMC) in die entstehende Neointima einen Schlüsselprozess ^{3, 9, 10} dar. Die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen steht unter dem Einfluss multipler Wachstumsfaktoren wie dem platelet – derived growth factor (PDGF), dem transforming growth factor- β (TGF- β), dem Angiotensin II (Ang. II), dem epidermal growth factor (EDGF) und dem insulin like growth factor 1 (ILG 1) ¹¹⁻¹⁴.

Über die Herkunft dieser glatten Gefäßmuskelzellen existieren unterschiedliche Theorien: Zum einen könnten die VSMCs der neu entstehenden Neointima aus bereits residenten Zellen der Intima hervorgehen, zum anderen ist aber auch eine Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media und sogar aus der Adventitia ¹⁵ möglich. Darüber hinaus konnten jüngste Studien auch eine Differenzierung

zirkulierender Progenitorzellen zu vaskulären glatten Muskelzellen nachweisen¹⁶, welche zur Bildung einer Neointima beitragen.



© C. Schneeweis

Abb. 1:

Mögliche Herkunft der Zellen der neu entstehenden Neointima

- | | |
|------------------------|---------------------------------|
| 1 Zelle der Adventitia | 3 Zelle der Intima |
| 2 Zelle der Media | 4 Zirkulierende Progenitorzelle |

Die Abbildung stellt die zuvor erwähnten unterschiedlichen Theorien, welche zur Herkunft der Zellen der Neointima existieren, zusammenfassend dar.

Im frühen Stadium der Arteriosklerose scheinen VSMCs die Entwicklung von Gefäßläsionen zu triggern, indem sie die Synthese von proinflammatorischen Mediatoren, z.B. monocyte chemoattractant protein 1, Zelladhäsionsmoleküle und Matrixproteinen, welche für die Speicherung von Lipoproteinen essentiell sind, unterstützen. Hierdurch tragen die glatten Gefäßmuskelzellen maßgeblich zu der Bildung von arteriosklerotischen Läsionen¹⁷ bei.

Zudem scheinen die VSMCs aber auch eine bedeutende Rolle für die Stabilisierung von arteriosklerotischen Plaques zu spielen, da sie für die Ausbildung einer stabilen fibrösen Kappe verantwortlich sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Regionen, die nur eine dünne instabile fibröse Kappe aufweisen, auch eine verstärkte Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen stattfindet und ein verstärktes inflammatorisches Geschehen zu beobachten ist¹⁸.

Zusammenfassend kann man sagen, dass glatten Gefäßmuskelzellen eine bedeutende Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose beigemessen werden muss, da sie in allen Stadien der Pathogenese involviert sind. Durch zunehmende arteriosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße kommt es zu flusslimitierenden Koronarstenosen, welche sich in der koronaren Herzkrankheit (KHK) manifestieren. Aus der KHK kann schließlich ein Myokardinfarkt resultieren, wenn es zu einer Plaqueruptur und anschließendem thrombotischen Verschluss der Arterie kommt.

1.2 Therapiemöglichkeiten

Zur Verhinderung arteriosklerotischer Plaquebildung sollten primär die Lebens- und Ernährungsgewohnheiten zu einer gesünderen Ernährung geändert werden. Moderater Ausdauersport, Gewichtsreduktion, fett- und salzreduzierte Nahrung und Nikotinverzicht wären hier als Ziele zu nennen. Erst wenn diese Maßnahmen nicht erfolgsversprechend sind, stehen in den weiteren Therapieregimen medikamentöse und letztendlich auch interventionelle Verfahren zur Verfügung. In der medikamentösen Therapie haben sich unterschiedlichste Substanzgruppen bewährt. Dabei stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung, deren Spektren von ACE (angiotensin converting enzyme)- Hemmern, AT II (Angiotensin II-Rezeptor)- Blockern, spezifischen β_1 -Rezeptor- Blockern, Calciumkanalblockern, Diuretika, antiadrenerge Substanzen bis hin zu Vasodilantien reichen.

Zu den etablierten invasiven Verfahren gehören die kardiochirurgische Bypass-Operation und die kardiologische perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA). Doch leider lässt sich auch nach einer invasiven Intervention häufig eine Rückkehr der kardialen Beschwerden nicht vermeiden, da es innerhalb kurzer Zeit zur Ausbildung einer Restenose kommen kann. Bei 30-40% der Patienten, die sich einer PTCA unterzogen haben, bilden sich innerhalb der folgenden sechs Monate

Restenosen aus ⁴. Selbst bei Einlage eines Stents ist die Restenoserate mit über 20% immer noch inakzeptabel hoch ⁴.

Dieses vaskuloproliferative Geschehen wird durch mechanische, biochemische und entzündliche Schädigung der Gefäßwandzellen verursacht. Der Verletzungsreiz führt zu einer Reihe von Folgereaktionen, die Inflammation, Aktivierung und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen nach sich ziehen ³. Ebenso wie bei der Pathogenese der Arteriosklerose sind auch die Mechanismen, die zur Entstehung einer Restenose führen, noch nicht hinlänglich geklärt.

Unzählige Cytokine und Wachstumsfaktoren konnten in den entstandenen Läsionen beobachtet werden und entstammen möglicherweise den Thrombozyten, VSMCs oder Entzündungszellen und vermitteln die Chemotaxis, Zellimmigration, Zellproliferation, Apoptose und die Einlagerung von Matrixproteinen ⁹.

Neueste Therapieansätze konzentrieren sich auf die Hemmung der überschießenden Hyperplasie der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs), welche hauptsächlich für die Entstehung der Restenose verantwortlich gemacht wird. Auch moderne radiologische Interventionen zeigten Erfolg, so konnte die Restenose-Rate durch strahlentherapeutische Ansätze deutlich beeinflusst werden ¹⁹⁻²¹. Ein weiterer Ansatz, um die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen zu stoppen, besteht darin, Signaltransduktionsvorgänge mit proliferatorischer Wirkung zu unterbinden, um so eine intimale Hyperplasie zu verhindern. Neben einer großen Anzahl vielversprechender Substanzen wie Paclitaxel (Taxol) ²², Flavopiridol ²³ oder CVT-313 ²⁴ ist das Makrolid-Antibiotikum Rapamycin eine der zur Zeit vielversprechendsten Substanzen: Sirolimus konnte seine Wirksamkeit bei der Verhinderung einer Restenose in mehreren Studien (RAVEL, SIRIUS, E-SIRIUS und C-Sirius), bei denen insgesamt 1.748 Patienten untersucht wurden, deutlich unter Beweis stellen ^{6, 25-27}. Aber auch die Wirksamkeit von Paclitaxel, in Bezug auf die Reduktion einer Restenose, konnte in den TAXUS- Studien (TAXUS I, II, IV und VI) unter Beweis gestellt werden ^{6, 28}. Unvorhersehbare

Nebenwirkungen, wie eine späte In-Stent-Thrombose oder die Ausbildung proximaler oder distaler Stenosen („candy wrapper effect“), zeigen jedoch die Notwendigkeit weiterer Studien auf diesem Gebiet.

Folglich fokussiert sich nun das Interesse auf den Zellzyklus, um in diesen oder in die Signaltransduktionsvorgänge, welche regulierend und aktivierend in den Zellzyklus eingreifen, therapeutisch zu intervenieren. Signaltransduktionsvorgänge stellen den idealen Angriffspunkt dar, da durch gezieltes Eingreifen eine überschießende Umsetzung von proliferativen Signalen unterbunden werden kann, was die Proliferation der Zellen und somit auch die Entstehung der Restenose hemmt. Somit könnte direkt nach der PTCA eine mögliche Restenose durch einen prophylaktischen Eingriff in die Signaltransduktion verhindert werden.

Daher ist es von Interesse die Signaltransduktionswege zu entschlüsseln, um sie so modellieren zu können, dass daraus eine präventive und kausale Therapie resultiert.

1.3 Die Bedeutung des HER2/neu (erbB2) Proto-Onkogens

Das HER2/neu Gen codiert für einen 185 kDa transmembranären Rezeptor (HER2/neu = erbB2), welcher zur Familie der ‚epidermal growth factor receptors‘ (EGFR) zählt und intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität aufweist. Die Familie der EGFR wird insgesamt aus vier Rezeptoren (EGFR = erbB1 = HER1, erbB2 = HER2/neu, erbB3 = HER3 und erb4 = HER4) gebildet.

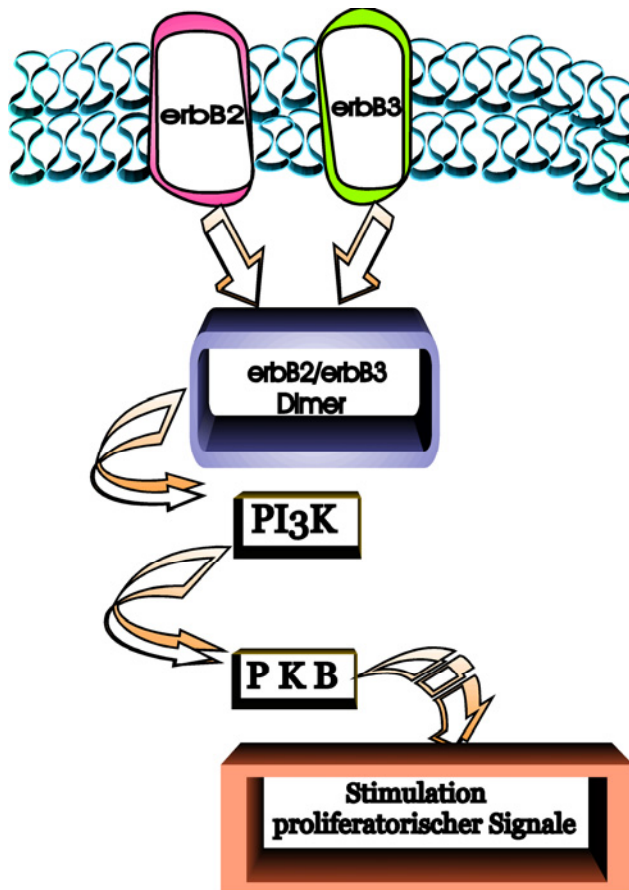
In naher Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine übermäßige Expression des HER2/neu-Rezeptors in unterschiedlichsten Krebsarten vorliegt^{29, 30}.

Einen zentralen Stellenwert nimmt die Expression des HER2/neu-Rezeptors im Falle des Mamma-Karzinoms ein: In über 30% der Fälle wurde eine Expression des Rezeptors beobachtet. Darüber hinaus besteht hier eine direkte Relation zwischen dem Expressionsspiegel und der davon abhängigen Prognose^{31, 32}. Je höher das Expressionslevel von HER2/neu in den Tumoren ist, desto schlechter ist auch die Prognose der Erkrankung. Daher hat sich seit einiger Zeit eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper TRASTUZUMAB (Herceptin©) bei HER2/neu positiven Mamma-Karzinomen etabliert³³. Weitere Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass auch eine Assoziation zwischen einem metastatischen Prozess und der HER2/neu-Expression besteht³⁴.

Mittlerweise weiß man, dass HER2/neu allerdings alleine nicht suffizient agieren kann, sondern nur zusammen mit einem weiteren Membran-Bindungsprotein dem HER3 eine intrazelluläre Signaltransduktion induzieren kann. Der Komplex aus HER2/neu und HER3 fungiert als eine onkogene Einheit³⁵ und löst so einen Proliferationsreiz aus, welcher mittels des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)- Signaltransduktionsweges übertragen wird^{36, 37}. Weder HER1 noch HER4 konnten die Funktion von HER3 übernehmen³⁵, so dass die Tragweite der funktionellen Einheit ersichtlich wird.

Doch wie kommt es nun zur Aktivierung des HER2/neu-Rezeptors, wodurch letztendlich erst der Proliferationsprozess in Gang gesetzt wird? Bis jetzt ist zwar bekannt, dass es für drei der vier Rezeptoren der EGFR-Familie gesicherte Liganden gibt, allerdings ist kein Ligand für den HER2/neu-Rezeptor bekannt. Derzeit geht man davon aus, dass HER2/neu keinen eigenen Liganden besitzt, sondern durch das komplexe Zusammenspiel mit anderen aktivierten Rezeptoren der EGFR-Familie selbst aktiviert wird³³.

Es ist anzunehmen, dass die beiden Rezeptoren HER2/neu und HER3 sich in ihrer Funktion ergänzen und so das komplexe Bindeglied zwischen extrazellulären Signalen und dem PI3K-Signaltransduktionsweg darstellen. Denn wie schon oben erwähnt scheint kein eigener Ligand für den HER2/neu-Rezeptor zu existieren, und dem HER3-Rezeptor fehlt die eigenständige Fähigkeit zur Tyrosinkinase-Aktivität³³. Über Liganden für den HER3-Rezeptor kann es dann durch Dimerisierung mit dem HER2/neu-Rezeptor zur Signaltransduktion mittels Tyrosinkinase-Aktivität kommen. Eben dieser Dimer aus HER2/neu und HER3 agiert mit der p85-Untereinheit der PI3K und löst so deren Aktivierung aus. Als Folge aktiviert nun die PI3K die 2nd-Messenger Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P) und Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PI(4,5)P₂) durch Phosphorylierung zu Phosphatidylinositol-3,4-diphosphat (PI(3,4)P₂) und Phosphatidylinositol-3, 4,5-triphosphat (PI(3, 4,5)P₃), welche wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung der Protein Kinase B führen (PKB/Akt). AKT greift nun nicht nur in den Zellmetabolismus, sondern auch in den Zellzyklus ein. AKT hemmt die Apoptose durch Antagonisierung von proapoptotischen Faktoren (Caspase-9, BAD). Außerdem hat AKT einen hemmenden Einfluss auf die ‚Forkhead Transkriptionsfaktoren‘^{38, 39}, welche ebenfalls proapoptotische Signale vermitteln.

**Abb.2:**

Intrazellulärer Signal-
Transduktionsweg, ausgelöst
durch die Aktivierung des
Her2/neu-Her3-Komplex
(erbB2/erbB3-Komplex)

© C. Schneeweis

Dieser Weg der Signaltransduktion macht deutlich, dass eine Aktivierung des HER2/neu-Rezeptors eine Hemmung der Apoptose und Aktivierung der Proliferation zur Folge hat. Eine Blockade des HER2/neu-Rezeptors könnte daher die Apoptose unterstützen und eine Proliferation verhindern.

Wenn man nun diese Erkenntnisse auf die Rolle des HER2/neu-Rezeptors in Gefäßen überträgt, könnte eine Blockade des Rezeptors zur Verhinderung von proliferatorischen Signalen führen, welche dann die Unterdrückung oder Reduktion einer neointimalen Proliferation zur Folge hätte.

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der neointimalen Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nach traumatischer Dilatation und der Expression des HER2/neu-Rezeptors besteht.

Der HER2/neu-Rezeptor ist im normalen Gewebe kaum nachweisbar, sehr wenig ist über dessen Expression im vaskulären Gewebe und nichts über eine mögliche Beteiligung bei der Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen bekannt.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und verwendete Software

| | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Adobe Photoshop 7.0 LE | ADOBE SYSTEMS INC., San Jose, USA |
| Kryostat CM 1900 | LEICA, Wetzlar, Germany |
| Mikroskop DM RB | LEICA, Wetzlar, Germany |
| Mikroskop S4 E | LEICA, Wetzlar, Germany |
| PC Pentium 600 | UNI-COMP, Giessen, Germany |
| Pipetten | GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich |
| Pipettenspitzen | GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich |
| Reaktionsgefäße 0,65/1,5/2ml | EPPENDORF, Hamburg, Germany |
| SigmaStat for Windows 3.1 | SYSTAT-SOFTWARE, Point Richmond, USA |
| Zeiss KS300 3.0 | ZEISS, Jena, Germany |

3.2 Chemikalien

| | |
|---|--|
| Antibody Diluent Reagent Solution | ZYMED San Francisco, USA |
| Aqua ad iniectabilia | BAXTER Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany |
| Dulbecco's Phospat Buffered Saline (1x) | PAA Laboratories GmbH, Pasding, Austria |

| | |
|----------------------------|--------------------------|
| 10 % Non-Immune Goat Serum | ZYMED San Francisco, USA |
| TissuTek ® | SAKURA Finetek Europe |
| | B.V., Zoeterwoude, NL |

3.3 Medikamente

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Atropinsulfat-Lösung 0,5 mg/ml | FRESENIUS KABI |
| | Deutschland GmbH, Bad |
| | Homburg, Germany |
| Isofluran-Baxter ® | BAXTER Deutschland GmbH, |
| | Unterschleißheim, Germany |
| Ketamin Incresa 50 mg/ml | INCRESA Arzneimittel GmbH, |
| | Freiburg, Germany |
| Lysostypt ® | BRAUN/AESCU LAP AG & |
| | Co. KG, Tuttlingen, Germany |
| Rompun ® 2 % | BAYER Vital GmbH, |
| | Leverkusen, Germany |
| Xylocain ® 2 % | ASTRA ZENECA GmbH, |
| | Wedel, Germany |

3.4 Chirurgische Instrumente und Operationsmaterialien

| | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Fäden Ethilon 6-0 (Nadel P-3) | JOHNSON & JOHNSON Intl, |
| | St-Stevens-Woluwe, Belgium |
| 1 gerader Führungsdraht | COOK Deutschland GmbH, |
| (20 cm lang, 0,5 mm dick) | Mönchengladbach, Germany |
| Injektionsnadeln BD Microlance™3 | BECTON, DICKINSON and |
| | Company, Drogheda, Co. Louth, |
| | Ireland |

| | |
|-----------------------------------|--|
| 1 Nadelhalter | AESCU LAP AG & Co. KG Tuttlingen, Germany |
| 2 kleine Pinzetten Typ OC 21 R | AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany |
| 1 Pinzette Typ 12-505-10 | MARTIN Medizin Technik, Tuttlingen, Germany |
| 1 Schere Typ BC 61 R | AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany |
| 1 Schere Typ BC 60 R | AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany |
| 1 Schere nach Vannas Typ OC 498 R | AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany |
| Spritzen Injekt F 1 ml | B. BRAUN, Melsungen, Germany |
| Spritzen Injekt 5 ml | B. BRAUN, Melsungen, Germany |
| Klebeband | |
| Eimer mit Deckel | |
| Tupfer | |
| Desinfektionsmittel | |

3.5 Antikörper

Primärantikörper:

| Antigen | HER2/neu | α-Aktin |
|------------------------------|---|---|
| Wirt | Hase | Maus |
| Isotyp | polyclonal IgG | monoclonal purified immunoglobulin |
| Konzentration | 200 μ g/ml | 1,1 mg/ml |
| verwendete Konzentration | 1 : 40 | 1 : 500 |
| Lagertemperatur | 4 - 8° C | 4 - 8° C |
| Bezug und Katalogbezeichnung | Santa Cruz <i>Neu (C-18): sc-284</i> | Sigma <i>C 6198 Monoclonal Anti-Actin, α-Smooth Muscle-Cy3</i> |

Sekundärantikörper:

| | Fluorescein (FITC) |
|---------------------|---|
| Wirt | Affe |
| Isotyp | IgG |
| Konzentration | 1,5 mg/ml |
| verw. Konzentration | 1 : 100 |
| Lagertemperatur | - 20 ° C |
| Bezug | Dianova Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC. |

3.6 Weitere Materialien / Verwendete Mäuse

DAPI

LINARIS Wertheim, Germany

(4, 6 Diamidino-2-phenylindole, 2HCl)

Bei allen operierten Mäusen handelte es sich um männliche Mäuse (BALB-C) der Firma CHARLES RIVER WIGA (Sulzfeld, Germany)

3.7 Operation der Maus

3.7.1 Vorbereitung der Narkose

Zur Narkose wird folgendes Narkoseschema verwendet:

- 1.) 1 ml Rompun ® wird mit 4 ml Ketanest ® in einer 5 ml Spritze gemischt
- 2.) 1 ml Atropin ® wird mit 4 ml NaCl in einer 5 ml Spritze verdünnt
- 3.) Im nächsten Schritt werden von den eben aufgezogenen 5 ml Spritzen jeweils 0,5 ml mit 0,5 ml NaCl 0,9 % in einer 1 ml Spritze verdünnt.
Zum Schluss wird noch Xylocain ® (im Verhältnis 1:10) nach Bedarf aufgezogen.

3.7.2 Vorbereitung der Operation

Zunächst wird der Operationsplatz unter dem Mikroskop (Leica S4 E) mit Papier abgeklebt, danach werden 2 Päckchen Faden geöffnet und die Nadel entfernt. Anschließend werden die Fäden in der Mitte geteilt. Sie werden während der Operation als Ligaturen dienen.

3.7.3 *Narkose*

Nach Narkoseeinleitung mittels Isofluran werden jeweils 0,1 ml von den vorbereiteten 1 ml Spritzen (Rompun ®, Ketanest ® und NaCl; Atropin ® und NaCl) subkutan im Bereich der Hinterläufe injiziert. Die Injektion erfolgt jeweils am rechten und linken Bein. Nun tritt eine tiefe Narkose ein und die Maus wird mittels Tapestreifen auf dem Rücken liegend im Sichtfeld unter dem Mikroskop fixiert. Die Fixierung erfolgt an allen Läufen, eine zusätzliche Fixierung erfolgt am Schwanz des Tieres.

3.7.4 *Operation*

Zu Beginn der Operation wird mit der kleinen gebogenen Schere das Fell am linken Hinterlauf im Operationsgebiet vorsichtig entfernt. Danach erfolgt die Desinfektion des Eingriffsgebietes. Nach Entfernung des Fells und Desinfektion kann bereits der Verlauf der Arterie, Vene und des Nervus femoralis erahnt werden. Es erfolgt ein Hautschnitt am distalen Ende des Hinterlaufs seitlich des Gefäß-Nerven-Verlaufs mittels der kleinen spitzen Schere, welcher vorsichtig nach proximal erweitert wird.

Jetzt erfolgt die Freilegung des Gefäß-Nerven-Stranges mit Hilfe der beiden kleinen Pinzetten. Anschließend werden die einzelnen Leitungsbahnen durch stumpfes Auftrennen der Faszien freigelegt. Dabei wird von distal nach proximal präpariert. Zunächst wird bis zum Abgang der A. femoralis profunda präpariert, anschließend erfolgt die Präparation proximal der A. femoralis profunda bis zur A. iliaca externa. Nun werden die Leitungsbahnen an der A. femoralis profunda aufgetrennt. Sind jetzt Arterie, Vene und Nerv dargestellt, wird der Nervus femoralis vorsichtig nach lateral verlagert, um eine intraoperative Schädigung zu vermeiden.

Nun müssen die Ligaturen angebracht werden. Zunächst erfolgt die Ligatur der distalen A. femoralis. Dabei wird der Faden von medial nach lateral unter der Arterie hindurchgeführt und wieder nach medial über die Arterie verlagert. Die Ligatur wird durch einen Klebestreifen lateral des

rechten Hinterlaufs fixiert. Bei dieser, genau wie bei den folgenden Ligaturen, wird darauf geachtet, dass die Durchblutung nicht unterbrochen wird. Die Ligaturen werden zunächst nur locker fixiert, um eine unnötige Ischämie zu vermeiden.

Mit dem zweiten Faden wird nun die A. femoralis profunda ligiert. Dabei wird zunächst der Faden von lateral, distal des Abgangs der A. femoralis profunda, unter der A. femoralis hindurchgeführt, anschließend wird der Faden von medial nach lateral, proximal des Abgangs der A. femoralis profunda, unter der A. femoralis durchgeführt und mit einem Klebestreifen lateral des linken Hinterlaufs fixiert.

Als letztes wird die A. iliaca communis ligiert. Hierbei wird eine möglichst proximale Ligatur angestrebt, um auch eine Unterbindung möglicher Anastomosen zu gewährleisten. Die Ligatur wird zunächst von lateral unter der A. iliaca communis durchgezogen und schließlich lateral des rechten Thorax ebenfalls durch einen Klebestreifen fixiert.

Zur Verdeutlichung der eben beschriebenen Ligaturen soll folgende Skizze dienen.

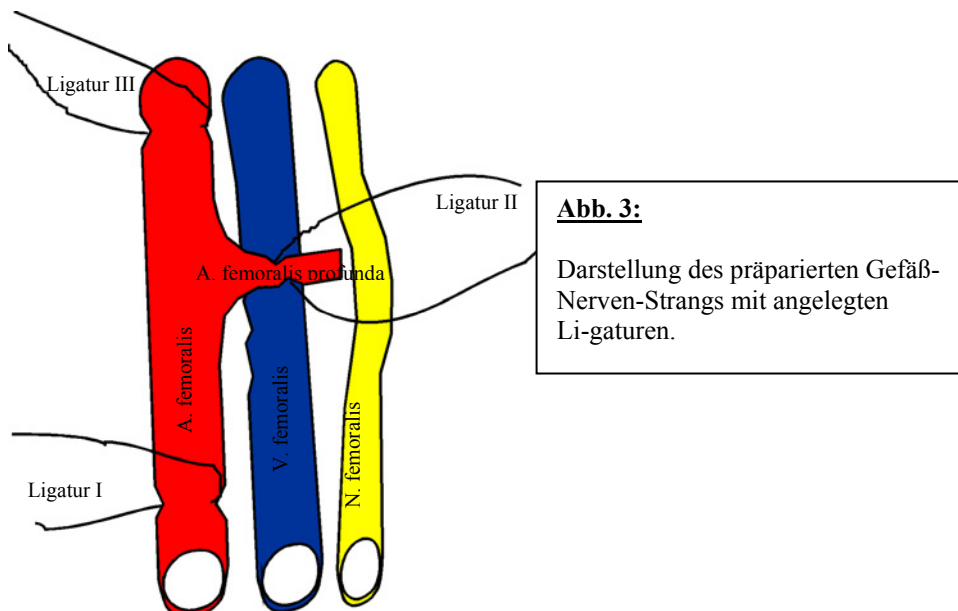


Abb. 3:

Darstellung des präparierten Gefäß-Nerven-Strangs mit angelegten Li-gaturen.

Nachdem nun alle Ligaturen angebracht sind, werden die einzelnen Ligaturen festgezogen, um den Blutfluss zu unterbinden. Dabei wird zunächst Ligatur I, dann Ligatur II und schließlich Ligatur III festgezogen.

Nach erfolgreicher Unterbindung des Blutflusses, erfolgt der Einschnitt der A. femoralis profunda. Hierzu werden die kleine Schere nach Vannas und die gebogene Injektionsnadel benötigt. Zunächst wird die A. femoralis profunda oberflächlich mit der Schere eingeschnitten. Ist der Einschnitt erfolgt, kann die kleine gebogene Injektionsnadel in die Inzision eingeführt werden, um das Einbringen des Dilatationsdrahtes in die Arterie zu erleichtern. Dabei wird die gebogene Spitze der Nadel in die Arterie eingesetzt und quer zur Verlaufsrichtung der A. femoralis profunda gezogen, um ein möglichst großes Lumen zu erzielen.

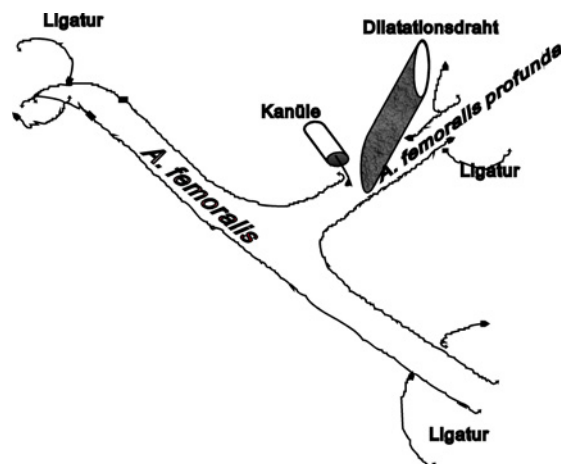
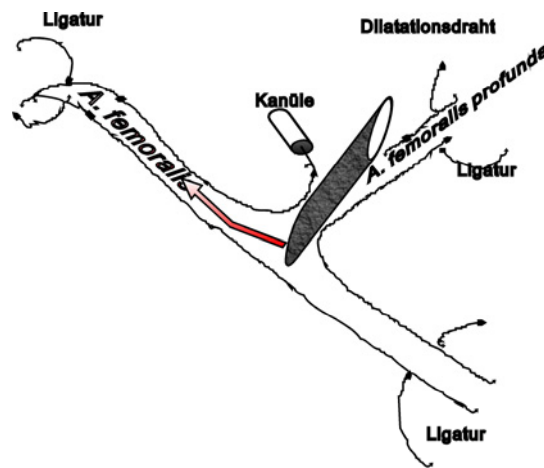


Abb. 4 und 5:

Grafische Darstellung der beschriebenen Vorgehensweise zur Dilatation der A. femoralis profunda. (Abbildung 5 befindet sich auf der Folgeseite)



© C. Schneeweis

Nun wird mit der gummierten Pinzette der Dilatationsdraht vorsichtig in die Arterie vorgeschoben. Ist der Draht erfolgreich positioniert, werden die Ligaturen gelockert, um eine unnötig lange Ischämie zu vermeiden. Der Draht verbleibt für eine Minute in der Arterie. Erst nach Ablauf der Zeit werden die Ligaturen wieder gestrafft, um den Draht mit möglichst geringem Blutverlust zu entfernen. Mit Hilfe einer gummierten Pinzette wird der Draht vorsichtig zurückgezogen. Kurz bevor der Draht aus der A. femoralis profunda herausgezogen wird, muss die Ligatur der A. femoralis profunda gelöst werden, um diese um den Draht zu legen. Jetzt wird der Draht entfernt und mit der eben bereitgelegten Ligatur die A. femoralis profunda durch doppelten chirurgischen Knoten ligiert, danach erfolgt die Entfernung der anderen Ligaturen. Im Falle einer fortwährenden Blutung wird eine zweite Ligatur gesetzt.

Anschließend werden die Leitungsbahnen wieder repositioniert und sich von der Effizienz der Ligaturen überzeugt. Danach erfolgt die Naht mittels 6-0 Prolene® Faden in fortlaufender Naht. Während der gesamten Operation wird darauf geachtet, dass das Operationsgebiet feucht bleibt, was mittels NaCl gelingt. Zur Stillung von eventuell auftretende Blutungen dient Lysostipt®.

Nach erfolgreicher Operation wird die Fixation gelöst und die Maus wird im Käfig unter eine Rotlichtlampe gestellt, um den intraoperativen Wärmeverlust auszugleichen.

Die folgenden intraoperativen Bilder sollen die eben beschriebene Vorgehensweise verdeutlichen.

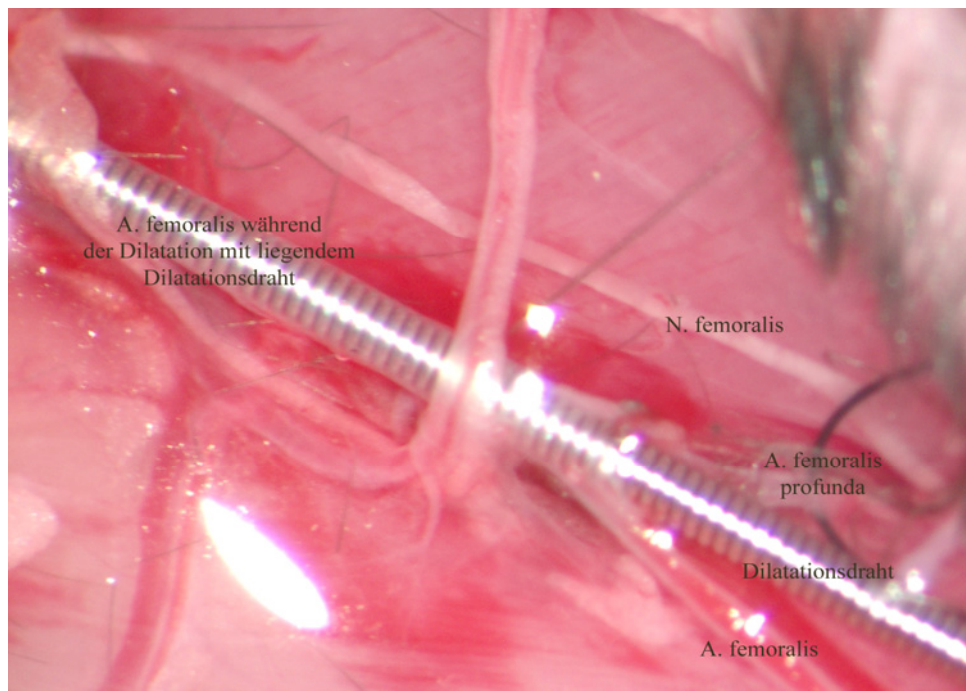


Abb. 6: Operationssitus während der Dilatation

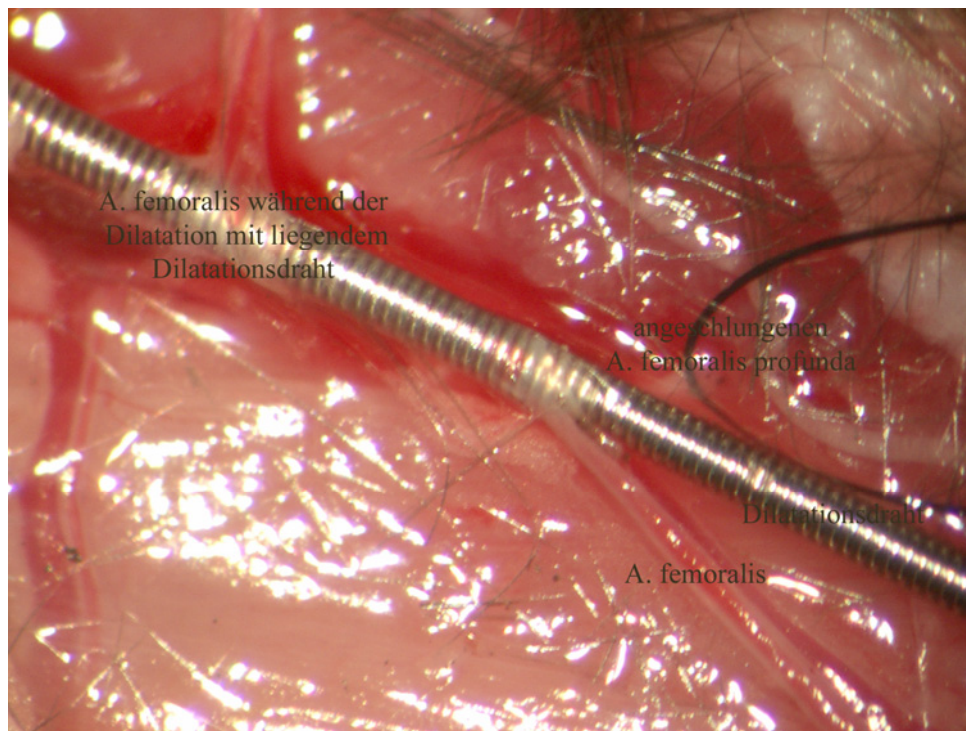


Abb. 7: Operationssitus während der Dilatation

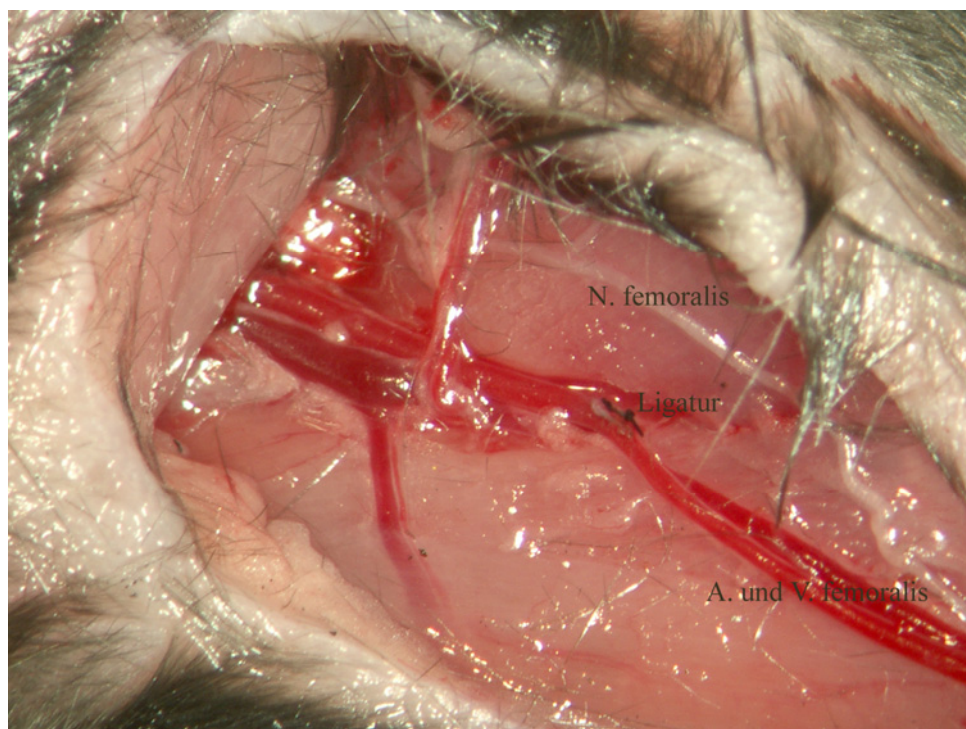


Abb. 8: Operationssitus nach abgeschlossener Operation mit Ligatur der A. femoralis profunda

3.8 Entnahme der Arteria femoralis

Die Maus wird mittels einer Überdosis Isofluran euthanasiert. Jetzt wird sie wie zur Operation (siehe oben) fixiert. Bei Eröffnung der alten Nahtstelle kommen bereits die aufzusuchenden Gefäßstränge zum Vorschein. Nun wird der dilatierte Teil der A.femoralis entnommen; zur Orientierung dient die Ligatur der A.femoralis profunda.

Nach erfolgreicher Entnahme wird das entnommene Stück in einer mit destilliertem Wasser gefüllten Petrischale geschwenkt, um Blutreste zu entfernen und so eine Reinigung des Arterienlumens zu erzielen. Im Anschluss wird die Arterie in einem mit Tissue Tek ® gefüllten Eppendorfgefäß in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt in einem Gefrierschrank bei - 80° Celsius.

3.9 Anfertigung der histologischen Schnitte

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurde der Kryostat LEICA CM 1900 verwendet. Das Schneiden erfolgt bei einer Temperatur von -24° Celsius. Zunächst wird die Arterie aus dem Eppendorfgefäß entfernt und auf einem Stempel fixiert, der in dem Schnittschlitten eingespannt wird und die Schichtdicke der Schnitte wird auf 6 µm festgelegt.

Auf jedem Objektträger werden zwei Schnitte aufgetragen, um bei den später folgenden immunhistochemischen Färbungen sowohl positive als auch negative Kontrollen auf einem Objektträger durchführen zu können. Anschließend erfolgt die Lagerung der Objektträger bei -20° Celsius.

3.10 Morphometrie

Um das Ausmaß der Neointimaentwicklung zu untersuchen, werden die Schnitte unter einem normalem Lichtmikroskop betrachtet und mit Hilfe des Computerprogramms ZEISS KS300 3.0 vermessen. Dabei wird zunächst der Gesamtdurchmesser des Gefäßes (= Media + Neointima + Lumen), anschließend das Lumen der Arterie und schließlich die Stärke der Neointima und Media ermittelt.

Nun wird die Neointima / Media-Ratio berechnet, indem zunächst das Lumen vom Gesamtwert des Gefäßes (= Media + Neointima + Lumen) subtrahiert wird und anschließend die beiden Werte der Media bzw. der Neointima in ein Verhältnis zueinander gesetzt werden.

3.11 Fluoreszenz-Immunhistochemie zum Nachweis des HER2/neu-Rezeptors und α -Aktin

Zunächst werden die Schnitte für 10 Minuten in einem Acetonbad fixiert und danach für 10 Minuten in PBS rehydriert, anschließend wird der Schnitt mit einem Fettstift in einem ausreichenden Abstand umfahren, um ein Verlaufen der aufzutragenden Agenzien zu verhindern.

Nun werden alle Schnitte mit dem 10 % Non-immune Goat-Serum für 10 Minuten geblockt. Das Serum wird nur durch leichtes Klopfen entfernt und nicht abgespült.

Nunmehr wird der erste Antikörper (Santa Cruz: *Neu (C-18)* : sc-284) in der oben angegebenen Verdünnung aufgetragen und für 45 Minuten auf dem Schnitt belassen. Anschließend werden die Schnitte dreimal für jeweils 2 Minuten in PBS gespült.

Danach werden die Antikörper gegen Fluorescein (FITC) und α -Aktin (Verdünnungen oben angegeben) in einem Arbeitsschritt aufgetragen und ebenfalls für 45 Minuten auf den Schnitten belassen. Im Anschluss werden die Schnitte dreimal für jeweils 2 Minuten in PBS gespült.

Da sich auf jedem Objektträger jeweils zwei Schnitte der zu untersuchenden Arterie befinden, kann gleichzeitig auch eine Kontrollfärbung durchgeführt werden, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers auszuschließen. Hierfür wird die Inkubation ohne den jeweiligen primären Antikörper und nur mit dem *FITC* Antikörper durchgeführt.

Um ein Austrocknen der Kontrollschnitte während des Färbens zu vermeiden, werden sie in der Zwischenzeit mit der ‚Antibody Diluent Reagent Solution‘ benetzt. Während der Fluoreszenz-Immunhistochemie werden die Schnitte möglichst vor Lichteinflüssen geschützt. Nach der Färbung werden die Schnitte mit Vectashield®, welchem zuvor DAPI hinzugefügt wurde (1 µl DAPI auf 1 ml Vectashield®), eingedeckelt. Um die Schnitte möglichst luftdicht zu verschließen, werden die Deckgläser mit klarem Nagellack umrandet und fixiert.

3.12 Bewertung der Fluoreszenz-Immunhistochemie

Als positive Kontrolle diene ein Schnitt eines pathologisch gesicherten stark HER2/neu exprimierenden Mamma-Karzinoms.

Anhand der eben beschriebenen Kontrollen kann nun eine Aussage getroffen werden, ob die zu untersuchenden Arterien eine HER2/neu-Rezeptor Expression aufweisen. Um beurteilen zu können, in welchem Grad eine Expression stattfindet, wurde ein Score von 0 - 3 festgelegt. Dabei ist ein Score von 0 als ein negatives Ergebnis zu werten, während ein Score von 3 den Maximalwert darstellt, welcher einer Expression im getesteten Mamma-Karzinom entspricht. Somit drückt ein Auswertungsergebnis von 1 eine geringe, aber vorhandene Expression des Rezeptors aus, während es sich bei einem Score von 2 um eine mittlere Expressionsrate handelt.

3.13 Statistische Auswertung

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- der mittleren Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Analysen der Ergebnisse erfolgten mit dem Programm SigmaStat for Windows 3.1 der Firma Systat-Software.

Die statistische Auswertung der Neointima/Media Ratio zur Beurteilung der Neointimaproliferation erfolgte über den Mann-Whitney Rang Summen Test.

Zur Beurteilung der HER2/neu-Expression in der gesamten Arterie wurde zunächst eine Kruskal-Wallis One Way ANOVA durchgeführt, um die Ergebnisse der einzelnen Zeitverläufe (0, 2, 3 und 4 Wochen) auf Signifikanz zu untersuchen.

Anschließend wurde die HER2/neu-Expression des einzelnen Zeitverlaufs (3 und 4 Wochen) auf einen signifikanten Unterschied zwischen der Expression innerhalb der Media und innerhalb der Neointima untersucht. Dazu musste bei dem 3 Wochen-Zeitverlauf ein Mann-Whitney Rang Summen Test und bei dem 4 Wochen-Zeitverlauf ein T-Test durchgeführt werden.

Komplettiert wurde die statistische Auswertung der HER2/neu-Expression durch einen Vergleich der Expressionslevels der Neointimae und Mediae (nach 3 und 4 Wochen) untereinander. Dabei wurde für den Mediavergleich der Mann-Whitney Rang Summen Test und für den Neointimavergleich der T-Test benötigt.

4. Ergebnisse

4.1 Traumainduzierte neointimale Proliferation nach Dilatation

Zunächst wurde untersucht, ob und in welchem Maße es zur Bildung einer Neointima nach Dilatation kommt. Die Vorstellung war, dass es als Reaktion auf das Trauma zu einer überschießenden Proliferation von VSMCs kommt, ähnlich wie diese als Restenose nach einer perkutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA) zu beobachten ist.

Es wurden Zeitverläufe über 2, 3 und 4 Wochen durchgeführt, nachdem in Vorversuchen keine Neointimaproliferation innerhalb der ersten Woche nach Dilatation nachweisbar war. In dem Zeitverlauf, bei dem die Arterien zwei Wochen post dilatationem untersucht wurden, wurde mit einer Anzahl von vier Tieren ($n = 4$) gearbeitet. Bei den Zeitverläufen von drei und vier Wochen wurden jeweils die Arterien von sechs Tieren ($n = 6$) begutachtet.

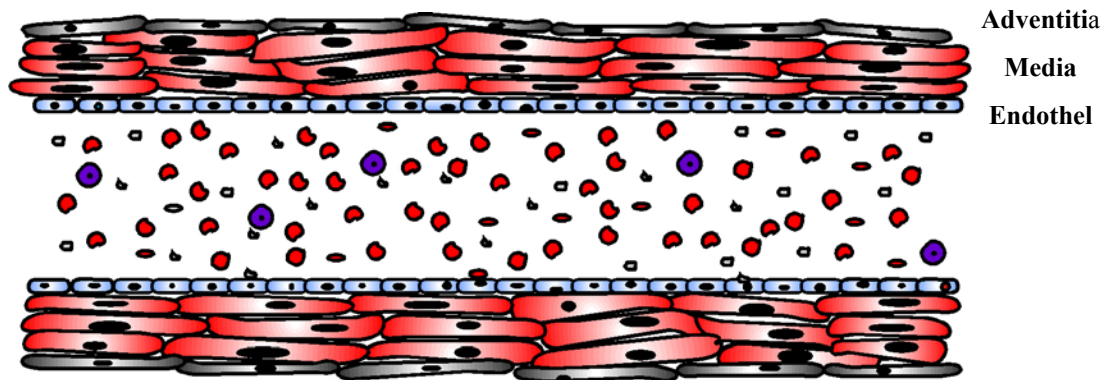


Abb. 9

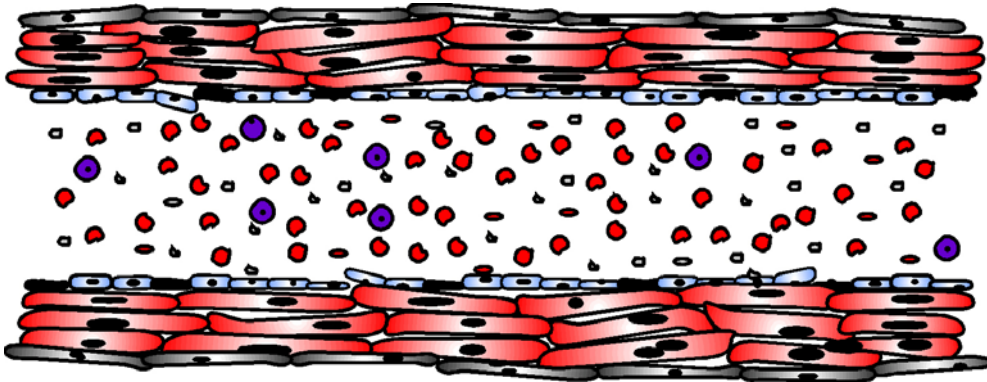


Abb. 10

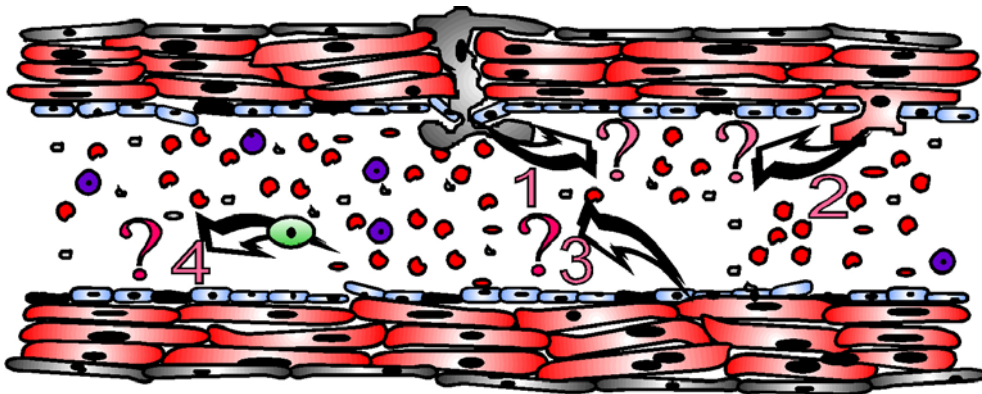


Abb. 11

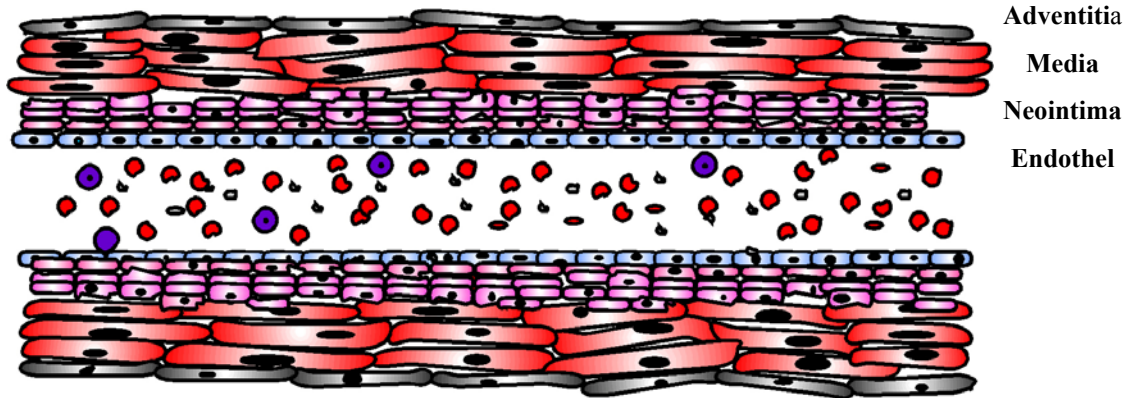


Abb. 12

© C. Schneeweis

Abb. 9 – 12:

Modell der Arterie im prä-dilatatorischen Zustand (Abb. 9) und direkt nach der Dilatation (Abb. 10).

Darstellung der unterschiedlichen Theorien der Zellherkunft, welche möglicherweise für die neointimale Proliferation verantwortlich sind (Abb. 11) und Arterie nach Ausbildung einer Neointima (Abb. 12).

Es zeigt sich zunächst, dass erste Anzeichen einer Neointimabildung bereits nach zwei Wochen zu beobachten sind, welche nach drei Wochen rapide zunehmen und nach vier Wochen ihr Maximum erreicht haben.

| | Mittelwerte im Vergleich |
|----------|--------------------------|
| 2 Wochen | $0,42 \pm 0,47$ |
| 3 Wochen | $1,40 \pm 1,75$ |
| 4 Wochen | $2,38 \pm 2,01$ |

Tab. 1:

Mittelwerte der Neointima/Media Ratio nach 2, 3 und 4 Wochen

Anhand der berechneten Mittelwerte wird ersichtlich, dass eine deutliche Neointimaentwicklung über den untersuchten Zeitraum zu beobachten ist, welche einem fast linear ansteigenden Wachstumsverlauf folgt und im Vergleich zu nicht dilatierten Arterien eine statistische Signifikanz zeigt ($p < 0,050$; Vergleich 2 Wochen nach Dilatation mit nicht dilatierten Arterien $p < 0,029$; Vergleich 3 Wochen nach Dilatation mit nicht dilatierten Arterien $p < 0,002$; Vergleich 4 Wochen nach Dilatation mit nicht dilatierten Arterien $p < 0,002$).

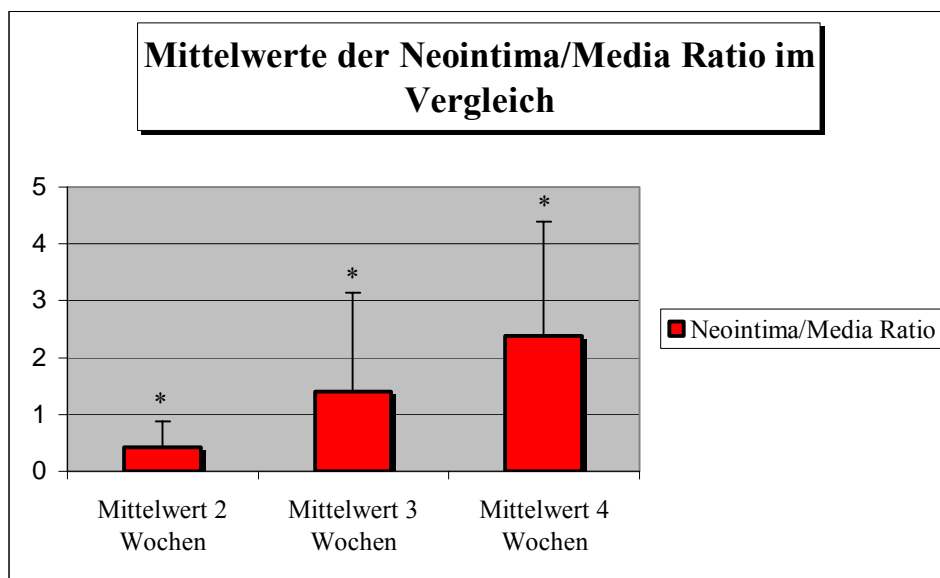
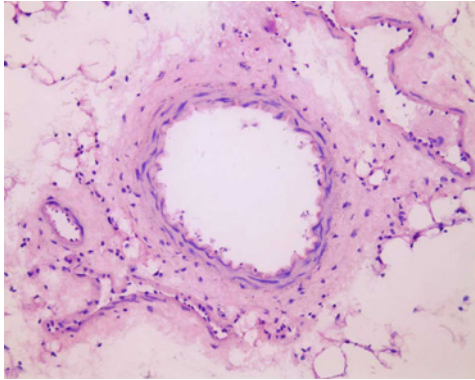
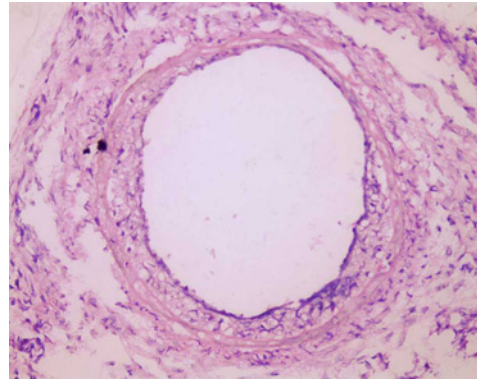
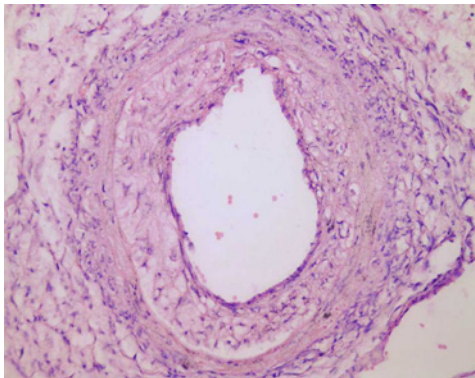
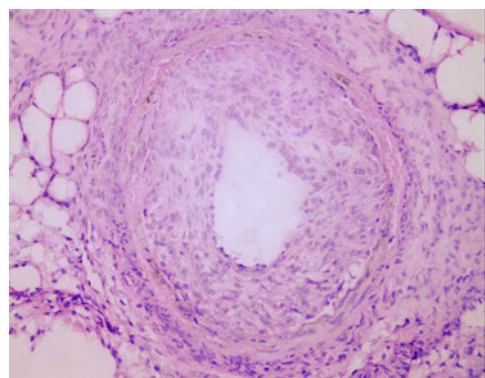


Abb. 13:

Grafische Darstellung der Neointima/Media Ratio der einzelnen Zeitverläufe. In der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney Rang Summen Test zeigte sich eine statistische Signifikanz der einzelnen Zeitverläufe im Vergleich mit nicht dilatierten Arterien ($p < 0,050$).

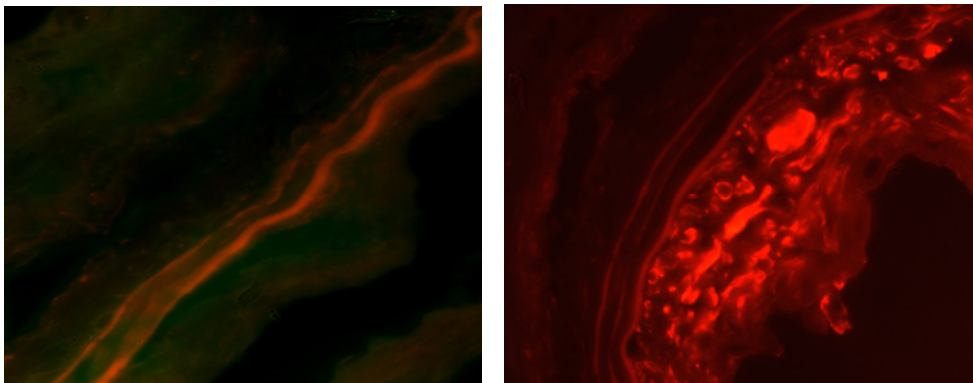
**Photo 1****Photo 2****Photo 3****Photo 4****Photos 1 bis 4:**

Die Photos demonstrieren die Entwicklung einer Neointima in den einzelnen Zeitverläufen in einer Hämatoxylin-Eosin-(HE-) Färbung, dabei zeigt Photo 1 eine nicht dilatierte Arterie, Photo 2 eine Arterie zwei Wochen nach Dilatation, Photo 3 eine Arterie drei Wochen nach Dilatation und Photo 4 eine Arterie vier Wochen nach Dilatation. (400-fache Vergrößerung)

4.2 Nachweis glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) in der Neointima

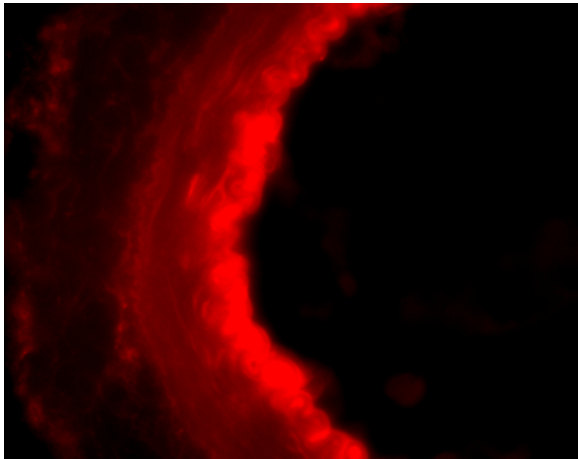
Durch die fluoreszenz-immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen intrazelluläres glattmuskuläres α -Aktin ließ sich zeigen, dass VSMCs in der Neointima resident sind und einen Großteil der Neointima bilden. Dieses Ergebnis war in allen Zeitverläufen zu beobachten.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Arterien in den einzelnen Zeitverläufen, wobei sich die spezifische Färbung gegen α -Aktin , aufgrund der Koppelung des Antikörpers mit cy 3, im roten Farbspektrum darstellt.

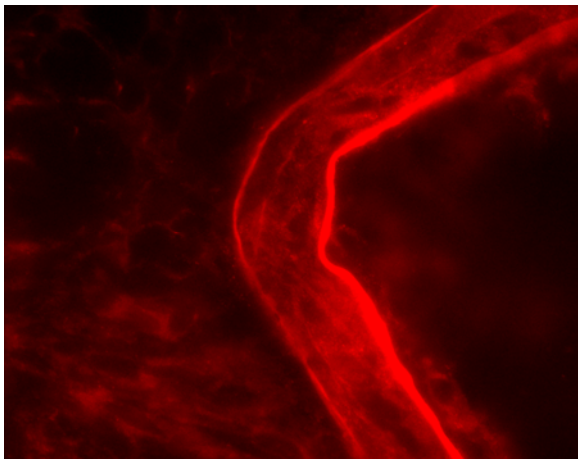


Photos 5 und 6:

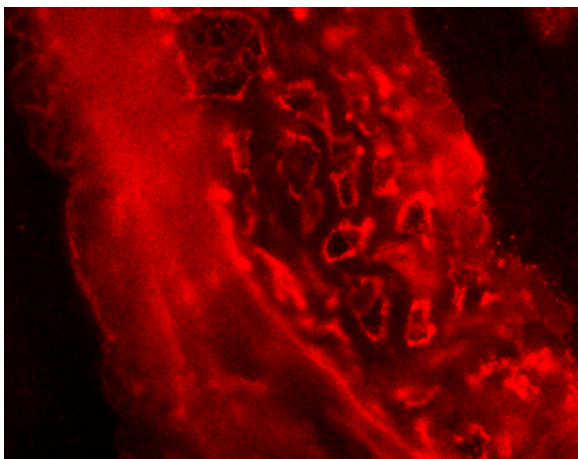
Zum Nachweis der Spezifität der fluoreszenz-immunhistochemischen Färbungen gegen α -Aktin zeigen die Photos 5 und 6 dieselbe Arterie 3 Wochen nach Dilatation. Photo 5 zeigt dabei die negative Kontrolle, während Photo 6 die positive Fluoreszenz-Immunhistochemie gegen α -Aktin zeigt. (630-fache Vergrößerung)

**Photo 7:**

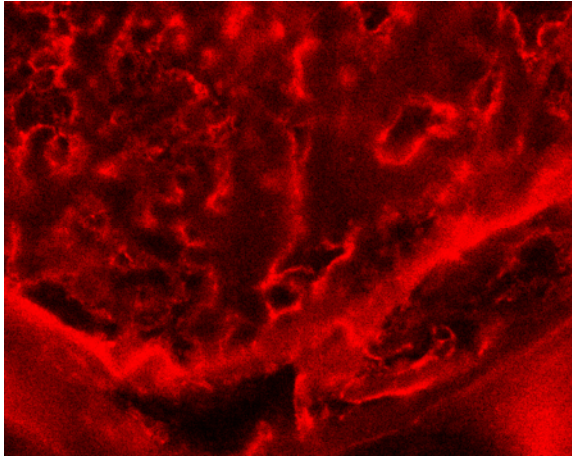
Nicht dilatiertes Gefäß mit einer fluoreszenzimmunhistochemischen Färbung gegen α -Aktin.
(630-fache Vergrößerung)

**Photo 8:**

Arterie 2 Wochen nach Dilatation in Fluoreszenz-Immunhistochemie zum Nachweis von α -Aktin.
(630-fache Vergrößerung)

**Photo 9:**

Ergebnis der Fluoreszenz-Immunhistochemie zum Nachweis von α -Aktin bei einer Arterie 3 Wochen nach Dilatation.
(630-fache Vergrößerung)

**Photo 10:**

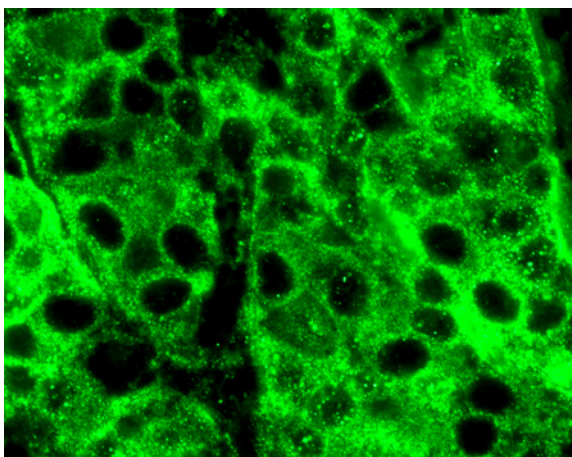
Ergebnis derselben Färbung,
4 Wochen nach Dilatation.
(630-fache Vergrößerung)

4.3 HER2/neu Rezeptor-Expression in dilatierten Gefäßen

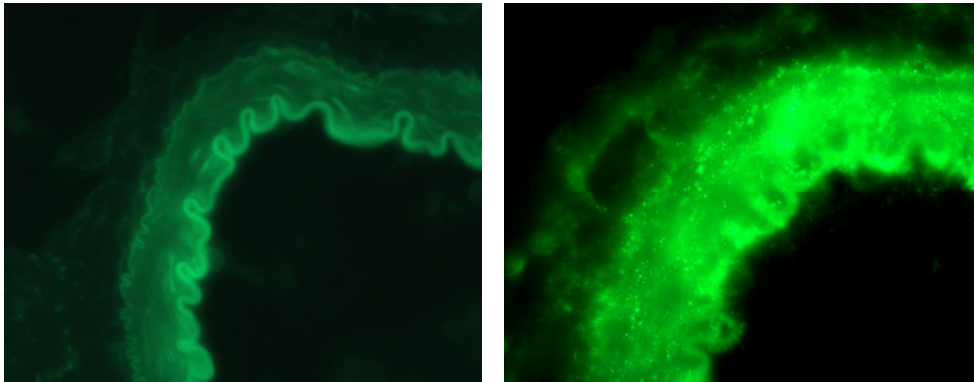
Es sollte untersucht werden, ob es bei einer traumainduzierten neointimalen Proliferation nach Dilatation zu einer veränderten Expression des HER2/neu-Rezeptors kommt.

Da Mamma-Karzinome in bis zu 30% der Fälle den HER2/neu Rezeptor exprimieren, dienten Kryoschnitte von HER2/neu-positiven Mamma-Karzinomen als Positivkontrolle für die vorgenommenen Färbungen.

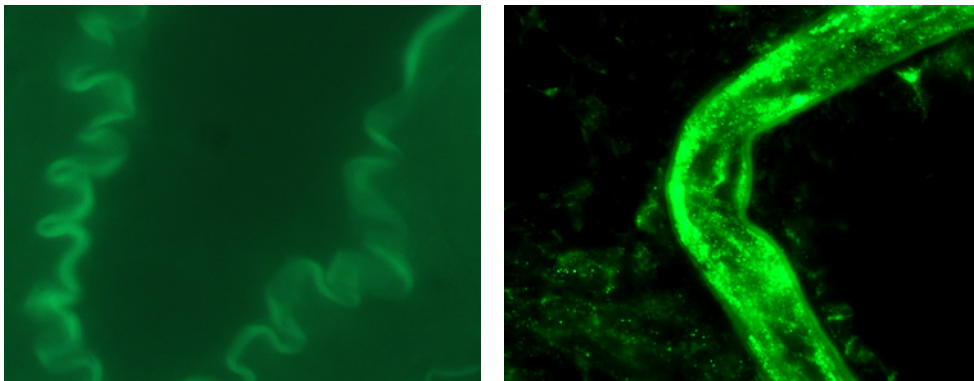
Im Folgenden sind exemplarische Immunhistochemien gezeigt.

**Photo 11:**

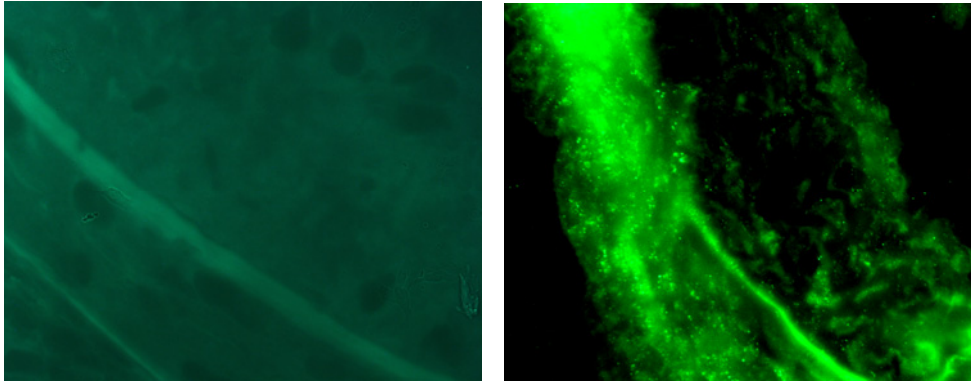
Das Photo zeigt ein stark
HER2/neu exprimierendes
Mamma-Karzinom nach
fluoreszenz-immunhisto-
chemischer Färbung und gilt
als Beweis der spezifischen
Färbung.
(630-fache Vergrößerung)

**Photos 12 und 13:**

Zum Nachweis der Spezifität der fluoreszenz-immunhistochemischen Färbungen gegen den HER2/neu-Rezeptor zeigen die Photos 12 und 13 zwei nicht dilatierte Arterien. Auf Photo 12 ist die negative Kontrolle zu sehen, während Photo 13 die positive Fluoreszenz-Immunhistochemie zeigt. (630-fache Vergrößerung)

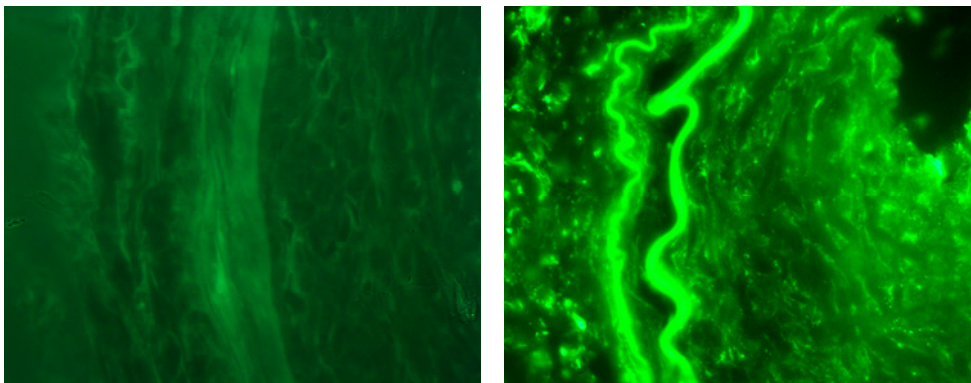
**Photos 14 und 15:**

Arterien 2 Wochen nach Dilatation, wobei Photo 14 eine negative Kontrolle zeigt und Photo 15 die positive Fluoreszenz-Immunhistochemie. (630-fache Vergrößerung)



Photos 16 und 17:

Arterien 3 Wochen nach Dilatation, wie bereits zuvor zeigt das erste Photo die negative Kontrolle der fluoreszenz-immnhistochemischen Färbung und das zweite die positive Färbung. (630- fache Vergrößerung)



Photos 18 und 19:

Die Photos zeigen Arterien 4 Wochen nach Dilatation mit sehr stark ausgeprägter Neointima, dabei zeigt Photo 18 die negative und Photo 19 die positive Fluoreszenz-Immunhistochemie gegen den HER2/neu-Rezeptor. (630-fache Vergrößerung)

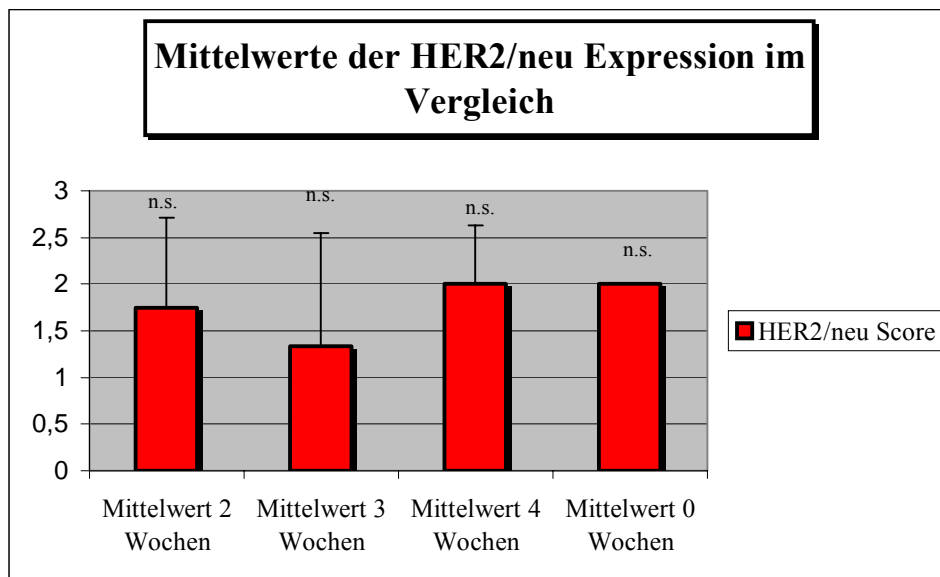
Die Abbildungen beweisen eine deutliche HER2/neu-Expression in den einzelnen Zeitverläufen. Wie in den HER2/neu positiven Mamma-Karzinomen lassen sich Rezeptoren erkennen, welche in der Fluoreszenz-Immunhistochemie als spezifische Färbungen dominieren.

Um eine Aussage über die Intensität der Expression machen zu können, wurde eine Score-Einteilung festgelegt, die zuvor bereits erläutert wurde. Die folgende Tabelle zeigt die Intensität der HER2/neu-Expression welche insgesamt in der Arterie, ohne Differenzierung zwischen Media und Intima, zu beobachten war.

| HER2/neu Score | Mittelwerte im Vergleich |
|---------------------|--------------------------|
| Mittelwert 0 Wochen | 2 ± 0 |
| Mittelwert 2 Wochen | $1,75 \pm 0,96$ |
| Mittelwert 3 Wochen | $1,33 \pm 1,21$ |
| Mittelwert 4 Wochen | $2 \pm 0,63$ |

Tab. 2:

Mittelwerte der HER2/neu-Expression nach 0, 2, 3 und 4 Wochen im Vergleich

**Abb. 14:**

Mittelwerte der HER2/neu Expression in der gesamten Arterie nach 2, 3 und 4 Wochen im Vergleich zu der Expression im nicht dilatierten Zustand. Die statistische Auswertung (Kruskal-Wallis One Way ANOVA) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen.

Die ermittelten Werte zeigen deutlich, dass bereits vor der Dilatation eine basale Expression des HER2/neu-Rezeptors vorhanden ist, welche nach der Dilatation keine Veränderung aufweist.

Um nun eine genaue Aussage darüber machen zu können, ob eine Differenz der Expression des HER2/neu-Rezeptors zwischen der Media und der Neointima besteht, wurden die Mediae und Neointimae getrennt begutachtet und dem selben Scoring unterzogen. Diese Differenzierung wurde auf die Zeitverläufe von 3 und 4 Wochen angewendet, da nach 2 Wochen noch keine wesentliche Neointimaentwicklung zu verzeichnen war.

| Mittelwerte der HER2/neu Differenzierung | 3 Wochen |
|--|-----------------|
| Media | $1,75 \pm 0,5$ |
| Neointima | $1,75 \pm 0,5$ |
| Mittelwerte der HER2/neu Differenzierung | 4 Wochen |
| Media | $2 \pm 1,15$ |
| Neointima | $1,75 \pm 0,96$ |

Tab. 3:

HER2/neu
Expression in
der Media und
Neointima im
Vergleich

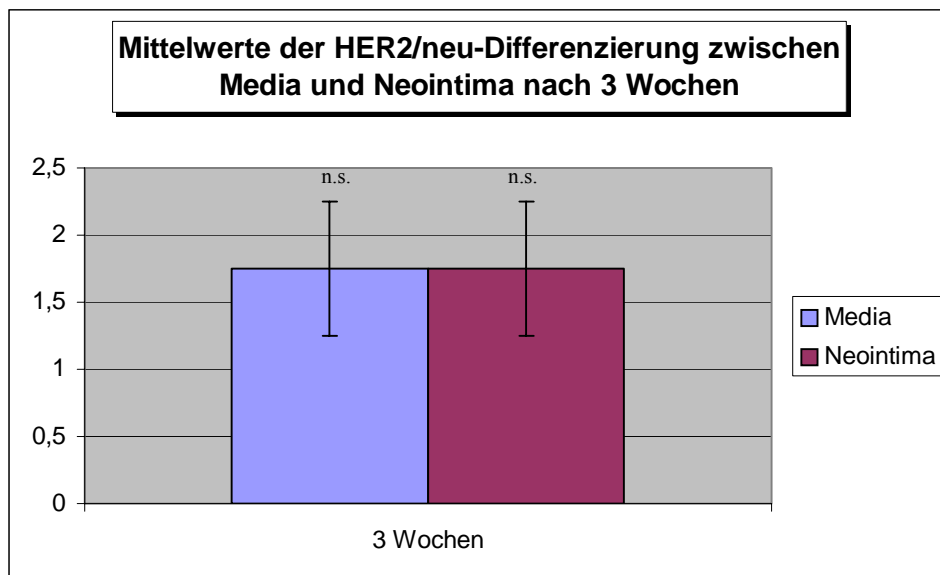


Abb. 15:

Grafischer Vergleich der HER2/neu Expression zwischen Media und Neointima nach 3 Wochen. In der statistischen Auswertung (Mann-Whitney Rang Summen Test) konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression gefunden

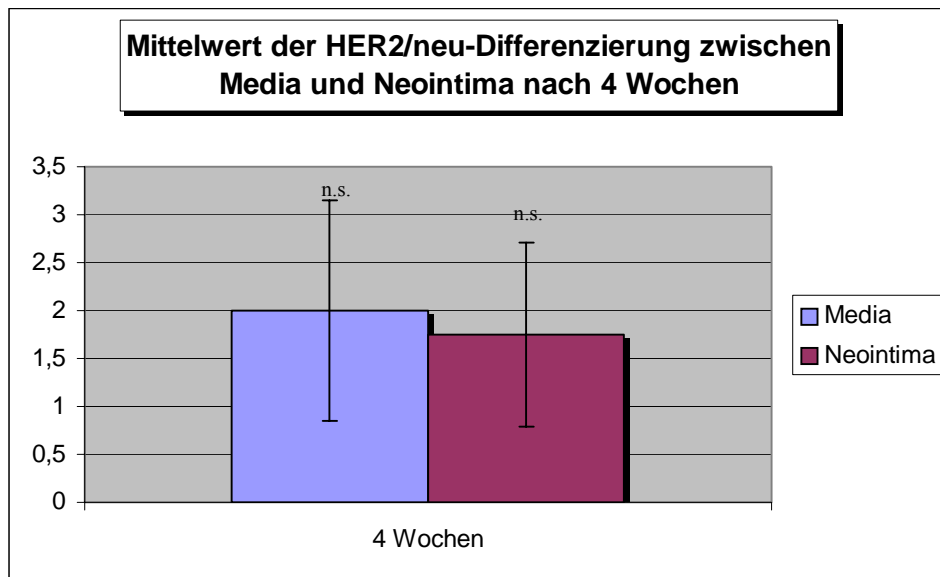


Abb. 16:

Grafischer Vergleich der HER2/neu Expression zwischen Media und Neointima nach 4 Wochen. In der statistischen Auswertung (T-Test) konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Expression gefunden werden.

Es ist deutlich zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in der Media und Neointima besteht. Weder nach 3, noch nach 4 Wochen kam es zu einem deutlichen Unterschied der HER2/neu-Expression.

Komplettiert wurde die Auswertung durch einen Vergleich der Mediae und Neointimae untereinander: sowohl ein Vergleich der Expression innerhalb der Mediae nach 3 und 4 Wochen, als auch der Neointimae nach 3 und 4 Wochen erbrachte keinen signifikanten Unterschied (Mediavergleich mittels Mann-Whitney Rang Summen Test; Neointimavergleich mittels T-Test).

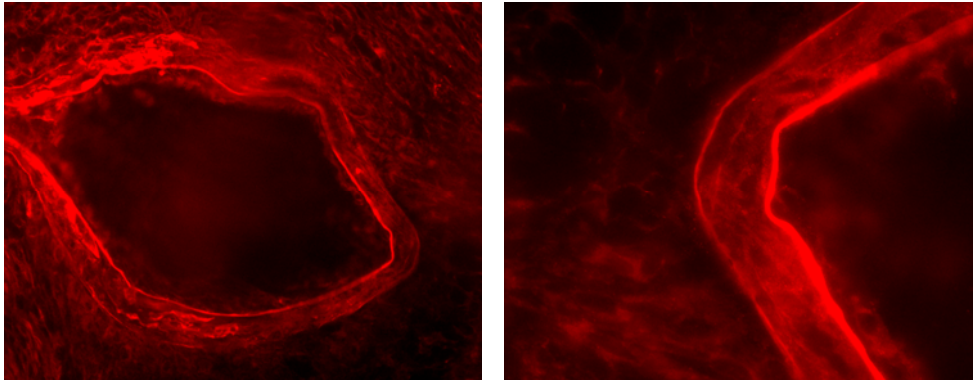
4.4 HER2/neu Rezeptor-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen

Da glatte Gefäßmuskelzellen in der Neointima detektiert werden konnten, wurde untersucht, ob diese den HER2/neu-Rezeptor exprimieren, was mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie gelang.

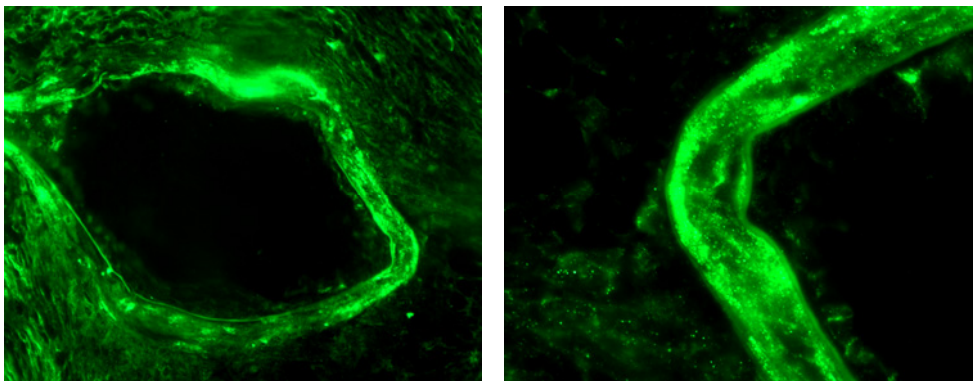
Durch eine fluoreszenz-immunhistochemische Färbung, welche sich zum einen gegen den HER2/neu-Rezeptor und zum anderen gegen das α -Aktin der VSMCs richtet, konnte belegt werden, dass glatte Gefäßmuskelzellen teilweise HER2/neu exprimieren. Die Lamina elastica externa und interna zeigen in jeder Färbung eine typische Eigenfluoreszenz und sind somit nicht spezifisch. Da der Antikörper gegen das intrazelluläre glattmuskuläre α -Aktin cy 3 gekoppelt ist, erscheint dieser in der Fluoreszenzmikroskopie als rotes Signal. Der Antikörper, der sich gegen den transmembranären HER2/neu-Rezeptor richtet, wurde durch einen sekundären FITC-Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und erzeugt damit ein grünes Farbspektrum.

Die folgenden Abbildungen sind alle so angeordnet, dass sie zunächst die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung gegen α -Aktin, dann die gegen den HER2/neu-Rezeptor und dann eine Überlagerungsfärbung, die sowohl gegen den HER2/neu-Rezeptor als auch gegen α -Aktin gerichtet ist, zeigen.

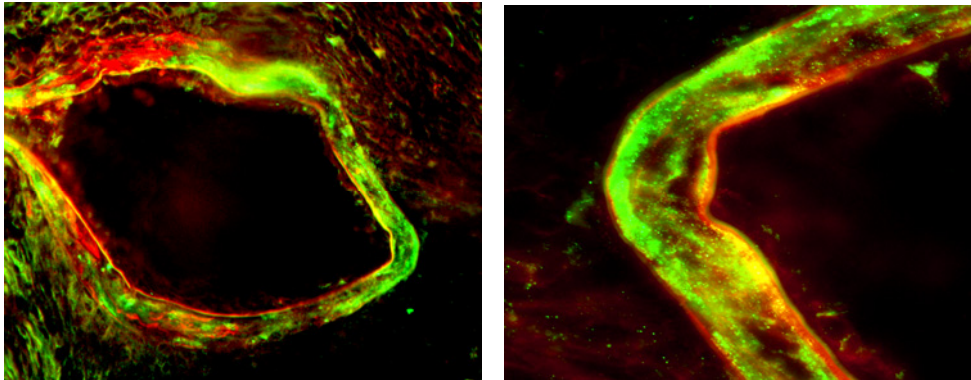
Damit werden zunächst die VSMCs in den Gefäßen sichtbar gemacht. Anschließend kann die HER2/neu-Aktivität nachgewiesen werden. In der dritten Färbung sehen wir schließlich, dass das HER2/neu von einigen VSMCs exprimiert wird, was sich dann aufgrund der Überlagerung der roten und grünen Signale in einem gelben Spektrum niederschlägt.

**Photos 20 und 21:**

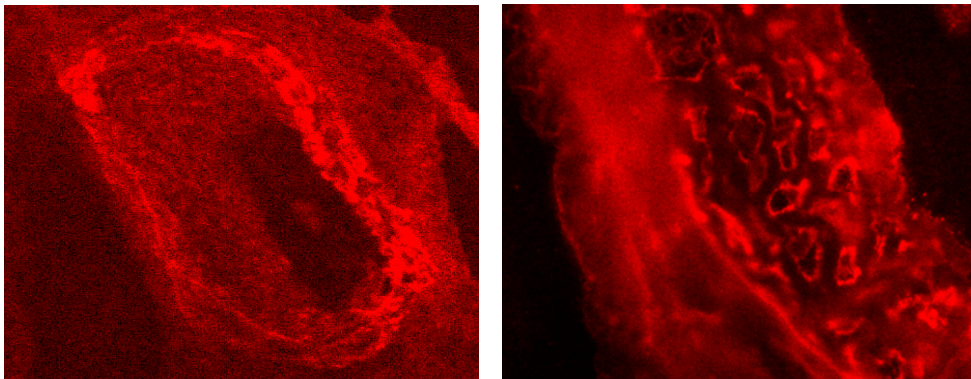
Die beiden Photos zeigen eine Arterie 2 Wochen nach Dilatation in Immunfluoreszenzfärbung gegen α -Aktin. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 22 und 23:**

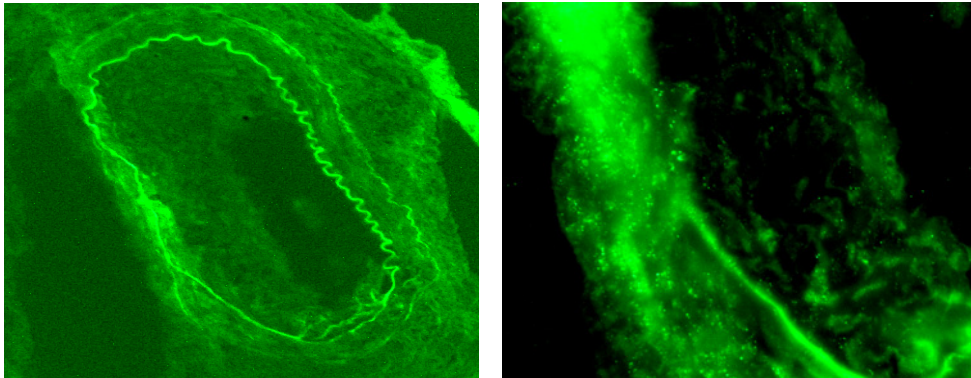
Die Photos zeigen dieselbe Arterie, wie auf den Abbildungen 20 und 21, diesmal allerdings in einer Immunfluoreszenzfärbung gegen den HER2/neu-Rezeptor. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 24 und 25:**

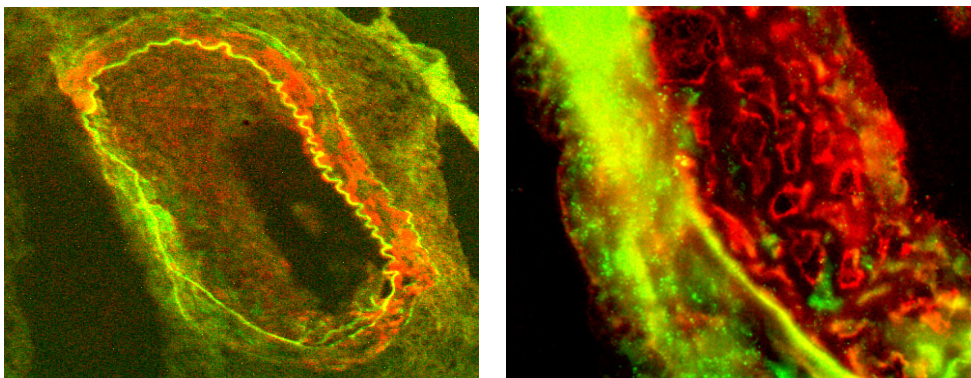
Dieselbe Arterie wie auf den Photos 20-23. Hier allerdings in einer fluoreszenz-immunhistochemischen Überlagerungsfärbung gegen den HER2/neu-Rezeptor und α -Aktin. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 26 und 27:**

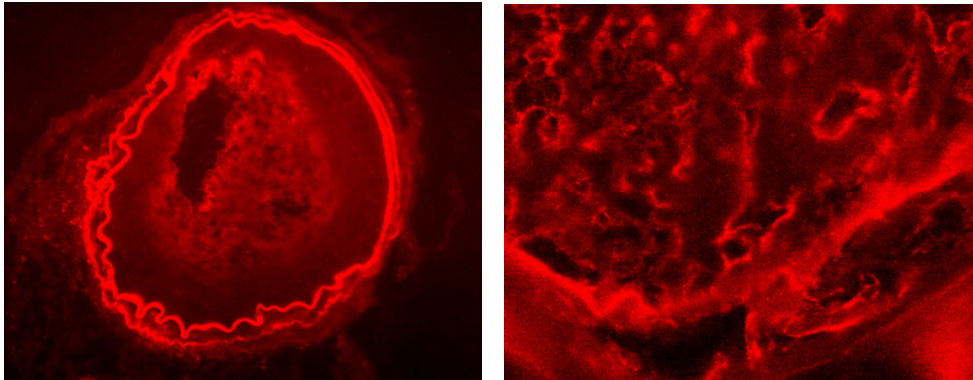
Arterie 3 Wochen nach Dilatation in einer Fluoreszenz-Immunhistochemie gegen α -Aktin. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 28 und 29:**

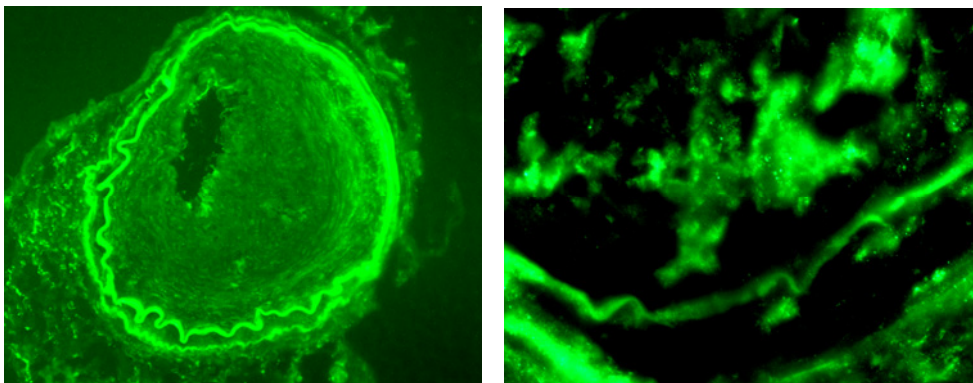
Die Photos zeigen die Ergebnisse der Fluoreszenz-Immunhistochemie gegen den HER2/neu-Rezeptor bei derselben Arterie wie in den Abb. 26 u. 27. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 30 und 31:**

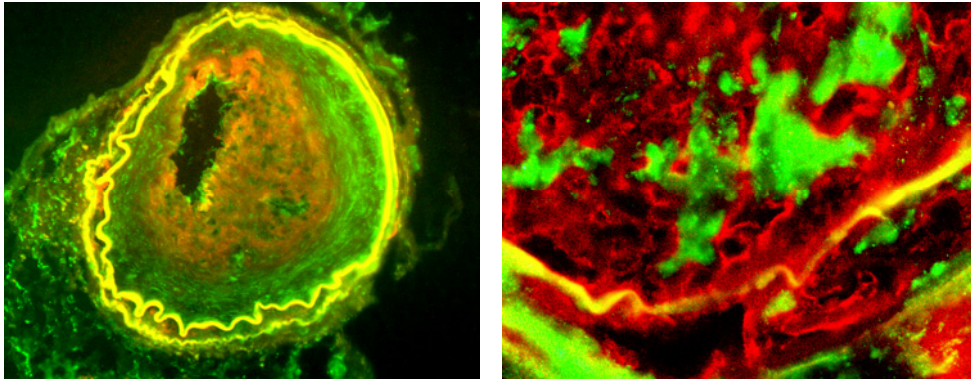
Die Photos zeigen die bereits in Einzelfärbungen dargestellte Arterie der Photos 26-29, in einer fluoreszenz-immunhistochemischen Überlagerungsfärbung gegen den HER2/neu-Rezeptor und α -Aktin. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 32 und 33:**

Die beiden Bilder zeigen eine Arterie 4 Wochen nach Dilatation in einer Fluoreszenz-Immunhistochemie gegen α -Aktin. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 34 und 35:**

Die bereits auf den Photos 32 und 33 dargestellte Arterie, ist hier in einer fluoreszenz-immunhistochemischen Färbung gegen den HER2/neu-Rezeptor dargestellt. (200- und 630-fache Vergrößerung)

**Photos 36 und 37:**

Diese Photos zeigen dieselbe Arterie, diesmal allerdings in fluoreszenz-immunhistochemischer Überlagerungsfärbung gegen α -Aktin und den HER2/neu-Rezeptor. (200- und 630-fache Vergrößerung)

5. Diskussion

Gefäßproliferative Erkrankungen nehmen einen immer größer werdenden Stellenwert in Bezug auf Mortalität und Morbidität ein, auch wenn die genauen Mechanismen der Entstehung bisher nur unzureichend bekannt sind.

Neben medikamentösen Behandlungen stellen invasive Verfahren schließlich die bisher einzig etablierten therapeutischen Instanzen dar. Eine dieser invasiven Möglichkeiten ist die PTCA (perkutane transluminale coronare Angioplastie), bei der das stenosierte Gefäß aufgedehnt wird. Zudem hat sich das Einlegen eines Stents in den stenotischen Bereich als sinnvoll erwiesen. Doch leider kommt es in über 20% der Fälle trotz Dilatation mit Implantation eines Stents zur Restenose⁵.

Als Therapieregime zur Behandlung der Restenose stehen radiotherapeutische Verfahren, intraluminale Bestrahlung mit β -Strahlern⁴⁰, invasive Verfahren wie Atherektomie⁴¹ oder PTCA mit oder ohne Implantation beschichteter Stents (mit Sirolimus⁴² oder Paclitaxel⁴³) oder koronarchirurgische Verfahren zur Verfügung.

In experimentellen Studien befinden sich die Gen-Therapie⁴⁴ und die Stammzelltherapie⁴⁵.

Das Wissen um die Faktoren, die eine Restenose begünstigen und induzieren ist jedoch weiterhin unzureichend. Erstmals wird in dieser Arbeit gezeigt, dass nach einer traumaassoziierten Dilatation mit Ausbildung einer Neointima eine Expression des HER2/neu-Rezeptors in den dilatierten Arealen vorhanden ist.

5.1 Bedeutung der traumainduzierten neointimalen Proliferation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die A. femoralis der Maus dilatiert und anschließend beobachtet, in welchem Zeitraum und in welchem Ausmaß sich eine Neointima als Reaktion auf den traumatisierenden Prozess entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass nach 2 Wochen eine sich entwickelnde Neointima zu erkennen war, die nach vier Wochen ihr Maximum an Wachstum erreicht hatte.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Proliferation neointimaler Zellen hauptsächlich zwischen der zweiten und vierten Woche stattfinden muss, da bis zur zweiten Woche nach Dilatation keine Neointima zu beobachten war.

Die Beobachtung dieser raschen Entwicklung einer Neointima verdeutlicht, dass sich eine traumainduzierte Stenosierung als ein akutes Ereignis darstellt, welches im Tiermodell an der Maus innerhalb der ersten Wochen manifest wird.

Im Ausblick auf die Problematik der Restenosierung nach einer PTCA kann vermutet werden, dass die Restenose ebenfalls durch die Traumatisierung der stenotischen Bereiche induziert wird und sich größtenteils innerhalb der ersten Wochen, beziehungsweise Monate nach der Dilatation entwickelt. So wurde bei Patienten nach Ballondilatation in bis zu 30% der Fälle eine Restenose nachgewiesen, welche schon in den ersten Monaten nach Intervention zu beobachten war^{4,5}.

5.2 Bedeutung des HER2/neu-Rezeptors an der Neointima-Proliferation

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass für das Mamma-Karzinom und andere solide maligne Tumoren eine negative Korrelation zwischen dem Exprimierungsspiegel des HER2/neu-Rezeptors und der klinischen Prognose besteht^{31, 32, 46, 47}. Zudem weisen Studien darauf hin, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer HER2/neu-Expression und einer Proliferation existiert⁴⁸.

Diese Ergebnisse machen verständlich, dass der monoklonale Antikörper TRASTUZUMAB (Herceptin®) gegen den HER2/neu-Rezeptor mittlerweile Eingang in die Therapie des HER2/neu positiven Mamma-Karzinoms gefunden hat und sich dort als fester Bestandteil der Therapie etablieren konnte^{29, 49}.

Über einen möglichen Zusammenhang zwischen vaskuloproliferativen Prozessen, insbesondere bei der Entwicklung einer Neointima nach Gefäßdilatation und einer HER2/neu-Rezeptor Exprimierung ist jedoch nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass bereits in nicht dilatierten Gefäßen eine HER2/neu-Expression innerhalb der Media vorhanden ist. Die Tatsache, dass auch eine Exprimierung nach der Dilatation vorlag und diese sich ebenfalls in den VSMCs der Neointima detektieren ließ, lässt die Vermutung aufkommen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Neointimawachstum und der HER2/neu-Exprimierung bestehen könnte.

Wir wissen derzeit nicht, ob der HER2/neu-Rezeptor ursächlich an der Signaltransduktion in VSMCs involviert ist, die zur Proliferation und Neointimaentwicklung führt, was weitere Studien auf diesem Gebiet notwendig macht. Ansätze wären hier beispielsweise in vitro Versuche, bei denen das Proliferationsverhalten von VSMCs unter Zugabe von Herceptin® untersucht wird, oder die Untersuchung einer

postdilatatorischen Neointimaentwicklung bei HER2/neu Knock-out Mäusen.

Wie zu Beginn der Arbeit bereits erwähnt wurde, benötigt der HER2/neu-Rezeptor Co-Rezeptoren, um aktiviert zu werden³⁵. Daher ist es also auch denkbar, dass eine Mutation oder eine veränderte Expression des benötigten HER3s eine Rolle in der möglichen HER2/neu abhängigen Proliferation von VSMCs spielt.

5.3 Mögliche Bedeutung der HER2/neu-Expression in der Media

In der Arbeit konnte sowohl eine Expression des HER2/neu-Rezeptors in der Media von nicht dilatierten Arterien, als auch von dilatierten Arterien nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob der HER2/neu Rezeptor eine physiologische und gegebenenfalls auch protektive Funktion für das Gefäß hat.

Wie bereits beschrieben, führt die Aktivierung des HER2/neu-Rezeptors zur Phosphorylierung und Aktivierung der Protein Kinase B (PKB/Akt), welche letztlich die Antagonisierung proapoptotischer Signale nach sich zieht. Daher könnte der HER2/neu-Rezeptor, da er in der Media nachzuweisen ist und hier keine Proliferation stattfindet, eine wichtige Rolle beim Erhalt der Gefäßhomöostase haben, indem er proapoptotische Signale eliminiert.

5.4 Denkbare therapeutische Ansätze und mögliche Konsequenzen

Eine therapeutische Option könnte darin bestehen, diesen stets vorhandenen HER2/neu-Rezeptor mit dem monoklonalen Antikörper TRASTUZUMAB (Herceptin®), welcher Teil der onkologischen Therapie bei HER2/neu positiven Mamma-Karzinomen ist und seine Wirksamkeit in mehreren Studien unter Beweis stellen konnte^{29, 49}, zu blockieren.

Wenn eine HER2/neu-Expression auch in menschlichen Restenosen nachzuweisen ist, könnte über eine Therapie mit Herceptin® nachgedacht werden, um damit eine Proliferationshemmung und Verhinderung einer Restenose zu erzielen. Im Rahmen einer solchen Überlegung müssen auch die möglichen Nebenwirkungen einer solchen Therapie in Betracht gezogen werden. Hier ist vor allem die kardiotoxische Nebenwirkung dominierend, welche in der Therapie von HER2/neu positiven Mamma-Karzinomen mit TRASTUZUMAB beobachtet wurde⁵⁰.

Eine lokale Applikation könnte helfen diese schwerwiegende Nebenwirkung zu umgehen und würde wahrscheinlich zusätzlich eine geringere Dosierung notwendig machen, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Doch auch eine lokale Therapie könnte mit negativen Folgen verbunden sein. So könnte es nicht nur zu einem Rückgang, beziehungsweise zu einer Unterdrückung der Neointimaproliferation kommen, sondern auch zu einer möglichen Mediaatrophie oder sogar Medianekrose. Denn möglicherweise hat der HER2/neu-Rezeptor auch eine unbekannte physiologische Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase, was bereits im vorigen Abschnitt diskutiert wurde.

6. Zusammenfassung

6.1 Deutsche Version

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Neointima nach Gefäßdilatation und einer möglichen Expression des HER2/neu-Rezeptors gibt.

Dazu wurde im Tierversuch die A. femoralis der Maus mittels eines Drahtes dilatiert und diese anschließend in unterschiedlichen Zeitverläufen (2, 3 und 4 Wochen) auf eine mögliche HER2/neu-Rezeptor Expression fluoreszenz-immunhistochemisch untersucht.

Die Resultate der durchgeführten Experimente bezüglich des HER2/neu-Rezeptors zeigten, dass bereits vor der Dilatation eine basale Expression des HER2/neu-Rezeptors innerhalb der Media vorhanden ist, welche nach der Dilatation keine Veränderung zeigt (Score nach 0 Wochen: 2; nach 2 Wochen: 1,75; nach 3 Wochen: 1,33; nach 4 Wochen: 2). Bereits in der entstehenden Neointima wird der Rezeptor in ähnlicher Intensität wie in der Media exprimiert (Score nach 3 Wochen in der Media 1,75 und in der Neointima, nach 4 Wochen in der Media 2 und in der Neointima 1,75).

Die HER2/neu-Expression könnte, wie für das Mamma-Karzinom gezeigt, einen Marker der Aktivität aber auch der Gewebekomöostase darstellen.

6.2 Englische Version (Summary)

Aim of this thesis was to investigate whether there is a link between the development of Neointima after balloon injury and possible expression of the HER2/neu-receptor. In an animal experiment, the femoral artery of a mouse was dilated with a wire and subsequently analysed at various elapsed times (2, 3 and 4 weeks), applying the fluorescence immunohistochemical method, for possible HER2/neu-receptor expression.

The results of the performed experiments concerning HER2/neu-receptor expression demonstrated that there was already a basal expression within the media of the vessel before dilation, which showed no alterations after dilation (score after 0 weeks: 2; after 2 weeks: 1,75; after 3 weeks: 1,33; after 4 weeks: 2). Additionally, HER2/neu-expression was present within the developing neointima to the same extent as within the media (score after 3 weeks: 1,75 in the media and in the neointima; after 4 weeks: 2 in the media and 1,75 in the neointima).

HER2/neu-expression levels could represent a marker of vascular wall-remodeling or neointimal proliferation.

7. Literatur

1. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. "Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease". *Lancet*. May 8 1999;353(9164):1547-1557.
2. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. "The good smooth muscle cells in atherosclerosis". *Curr Atheroscler Rep*. Sep 2000;2(5):422-429.
3. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies". *Nat Med*. Nov 2002;8(11):1249-1256.
4. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Belardi J, Sigwart U, Colombo A, Goy JJ, van dH, P., Delcan J, Morel M. "A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group". *N Engl J Med*. Aug 25 1994;331(8):489-495.
5. Schuhlen H, Kastrati A, Mehilli J, Hausleiter J, Pache J, Dirschinger J, Schomig A. "Restenosis detected by routine angiographic follow-up and late mortality after coronary stent placement". *Am Heart J*. Feb 2004;147(2):317-322.

6. Moreno R, Macaya C. "Stent-based delivered anti-proliferative drugs in the prevention of coronary stent restenosis". *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. Jul 2005;3(3):221-229.
7. Ross GW, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Li CY, Curb JD, Yano K, Rodriguez BL, Foley DJ, Blanchette PL, Havlik R. "Characterization of risk factors for vascular dementia: the Honolulu-Asia Aging Study". *Neurology*. Jul 22 1999;53(2):337-343.
8. Libby P, Ridker PM, Maseri A. "Inflammation and atherosclerosis". *Circulation*. Mar 5 2002;105(9):1135-1143.
9. Ross R. "Cell biology of atherosclerosis". *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
10. Ross R, Glomset JA. "Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis". *Science*. Jun 29 1973;180(93):1332-1339.
11. Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy MA. "Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury". *J Clin Invest*. Sep 1991;88(3):904-910.
12. Nabel EG, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D, Haudenschild CC, Nabel GJ. "Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo". *J Clin Invest*. Apr 1993;91(4):1822-1829.

13. Grant MB, Wargovich TJ, Ellis EA, Caballero S, Mansour M, Pepine CJ. "Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis?" *Circulation*. Apr 1994;89(4):1511-1517.
14. Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE. "Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia". *Hypertension*. Oct 1991;18(4 Suppl):III100-105.
15. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN. "Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries". *Circulation*. Jun 15 1996;93(12):2178-2187.
16. Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. "Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis". *Nat Med*. Apr 2001;7(4):382-383.
17. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. "The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis". *Circ Res*. Sep 1995;77(3):445-465.
18. Fuster V. "Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology". *Circulation*. Oct 1994;90(4):2126-2146.
19. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. "Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting". *N Engl J Med*. Jun 12 1997;336(24):1697-1703.

20. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. "A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators". *N Engl J Med*. Dec 3 1998;339(23):1665-1671.
21. Costa M, Sabate M, van dGW, Kay I, Cervinka P, Ligthart J, Serrano P, Coen V, Levendag P, Serruys P. "Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy". *Circulation*. Aug 24 1999;100(8):789-792.
22. Liistro F, Stankovic G, Di MC, Takagi T, Chieffo A, Moshiri S, Montorfano M, Carlino M, Briguori C, Pagnotta P, Albiero R, Corvaja N, Colombo A. "First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome". *Circulation*. Apr 23 2002;105(16):1883-1886.
23. Ruef J, Meshel A, Hu Z, Horaist C, Ballinger C, Thompson L, Subbarao V, Dumont J, Patterson C. "Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation In vivo after carotid injury in the rat". *Circulation*. Aug 10 1999;100(6):659-665.
24. Brooks E, Gray N, Joly A, Kerwar S, Lum R, Mackman R, Norman T, Rosete J, Rowe M, Schow S, Schultz P, Wang X, Wick M, Shiffman D. "CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation". *J Biol Chem*. Nov 14 1997;272(46):29207-29211.

25. Schampaert E, Cohen E, Schluter M, Reeves F, Traboulsi M, Title L, Kuntz R, Popma J. "The Canadian study of the sirolimus-eluting stent in the treatment of patients with long de novo lesions in small native coronary arteries (C-SIRIUS)". *J Am Coll Cardiol.* Mar 17 2004;43(6):1110-1115.
26. Morice M, Serruys P, Sousa J, Fajadet J, Ban HE, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. "A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization". *N Engl J Med.* Jun 6 2002;346(23):1773-1780.
27. Moses J, Leon M, Popma J, Fitzgerald P, Holmes D, O'Shaughnessy C, Caputo R, Kereiakes D, Williams D, Teirstein P, Jaeger J, Kuntz R. "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery". *N Engl J Med.* Oct 2 2003;349(14):1315-1323.
28. Lansky A, Costa R, Mooney M, Midei M, Lui H, Strickland W, Mehran R, Leon M, Russell M, Ellis S, Stone G. "Gender-based outcomes after paclitaxel-eluting stent implantation in patients with coronary artery disease". *J Am Coll Cardiol.* Apr 19 2005;45(8):1180-1185.
29. Albanell J, Baselga J. "Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer". *Drugs Today (Barc).* Dec 1999;35(12):931-946.
30. Bacus S, Altomare D, Lyass L, Chin D, Farrell M, Gurova K, Gudkov A, Testa J. "AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival". *Oncogene.* May 16 2002;21(22):3532-3540.

31. Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, de MI, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre J. "The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases". *Breast Cancer Res Treat.* Sep 1995;35(3):283-291.
32. Ross J, Fletcher J. "The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy". *Stem Cells.* 1998;16(6):413-428.
33. Nagy P, Jenei A, Damjanovich S, Jovin T, Szolosi J. "Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy". *Pathol Oncol Res.* 1999;5(4):255-271.
34. Falcioni R, Antonini A, Nistico P, Di SS, Crescenzi M, Natali P, Sacchi A. "Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines". *Exp Cell Res.* Oct 10 1997;236(1):76-85.
35. Holbro T, Beerli R, Maurer F, Koziczak M, Barbas C, 3rd, Hynes N. "The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation". *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 22 2003;100(15):8933-8938.
36. Yakes F, Chinratanalab W, Ritter C, King W, Seelig S, Arteaga C. "Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action". *Cancer Res.* Jul 15 2002;62(14):4132-4141.
37. Hellyer N, Kim M, Koland J. "Heregulin-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and Akt via the ErbB2/ErbB3 co-receptor". *J Biol Chem.* Nov 9 2001;276(45):42153-42161.

38. Sedding D, Seay U, Fink L, Heil M, Kummer W, Tillmanns H, Braun-Dullaeus R. "Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells". *Circulation*. Aug 5 2003;108(5):616-622.
39. Kops G, Burgering B. "Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling". *J Mol Med*. Sep 1999;77(9):656-665.
40. Angiolillo D, Sabate M. "Past, present, and future of intracoronary brachytherapy". *Ital Heart J Suppl*. Oct 2003;4(10):794-806.
41. Tsubokawa A, Ueda K, Sakamoto H, Iwase T, Tamaki S. "Acute and long-term outcomes of rotational atherectomy in small (< 3.0 mm) coronary arteries". *J Interv Cardiol*. Aug 2003;16(4):315-322.
42. Holmes D, Jr., Leon M, Moses J, Popma J, Cutlip D, Fitzgerald P, Brown C, Fischell T, Wong S, Midei M, Snead D, Kuntz R. "Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis". *Circulation*. Feb 10 2004;109(5):634-640.
43. Gershlick A, De SI, Chevalier B, Stephens-Lloyd A, Camenzind E, Vrints C, Reifart N, Missault L, Goy J, Brinker J, Raizner A, Urban P, Heldman A. "Inhibition of restenosis with a paclitaxel-eluting, polymer-free coronary stent: the European evaluation of paclitaxel Eluting Stent (ELUTES) trial". *Circulation*. Feb 3 2004;109(4):487-493.

44. Dzau V. "Predicting the future of human gene therapy for cardiovascular diseases: what will the management of coronary artery disease be like in 2005 and 2010?" *Am J Cardiol.* Nov 7 2003;92(9B):32N-35N.
45. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. "Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury". *Circ Res.* Jul 25 2003;93(2):e17-24.
46. Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ullrich A, McGuire W. "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene". *Science.* Jan 9 1987;235(4785):177-182.
47. Slamon D, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D, Levin W, Stuart S, Udove J, Ullrich A. "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer". *Science.* May 12 1989;244(4905):707-712.
48. Marmor M, Skaria K, Yarden Y. "Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors". *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar 1 2004;58(3):903-913.
49. Huober J, Jackisch C, Untch M, Mobus V, Wallwiener D, Kaufmann M, Minkwitz G. "Adjuvant therapy with trastuzumab (Herceptin) in primary breast cancer". *Zentralbl Gynakol.* Feb 2006;128(1):30-37.
50. Klein P, Dybdal N. "Trastuzumab and cardiac dysfunction: update on preclinical studies". *Semin Oncol.* Oct 2003;30(5 Suppl 16):49-53.

8. Lebenslauf**Tabellarischer Lebenslauf****Persönliche
Informationen**

- Staatsangehörigkeit: deutsch
- geboren: 08.08.1978
- Geburtsort: Münster
- Konfession: römisch-katholisch
- Familienstand: ledig, kinderlos
- Familie: Eltern Jutta Schneeweis-Schröer und Raymund Schneeweis
- Schwester Julie Schneeweis

Ausbildung

1984 - 1988

Grundschule

- „Schule im grünen Winkel“ Hamm

1988 - 1997

Abitur

- „Gymnasium Hammonense“ Hamm

1997 - 1998

Wehrdienst

- Schweres Pionierbataillon Emmerich
- Sanitätsregiment Hamm

1998 - 2000

Krankenpflegerausbildung im St. Marien-Hospital

Hamm

- Aufgabe der Ausbildung zu Gunsten des Studiums

2000 - 2006

Studium der Humanmedizin an der

Justus Liebig Universität

Gießen

Famulaturen :

- Allgemein- und Unfallchirurgie (St. Marien-Hospital Hamm)
- Kinderchirurgie (Evangelisches Krankenhaus Hamm)
- Innere Medizin (St. Barbara-Klinik Hamm)
- Praxis Dr. med. W. Sprute (Facharzt für Urologie)

**Berufliche
Nebentätigkeiten**

Messehost auf diversen Messen (IAA, CeBit, AMI, IFA) und im Promotionbereich

Mitgliedschaften

- V.K.D.St. Hasso-Rhenania zu Gießen im CV
- Marburg Saints Lacrosse

Interessen

Sportliche Aktivitäten: Rennradfahren, Lacrosse

Fremdsprachen

- Englisch (gute Konversation möglich)
- Italienisch (Grundkenntnisse)

9. Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich tatkräftig bei dieser Arbeit unterstützt haben und mir dadurch erst eine Dissertation ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. med. H. Tillmanns danke ich für die breite Unterstützung und Förderung wissenschaftlichen Arbeitens in seiner Abteilung, in deren Rahmen diese Arbeit entstehen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Rüdiger Braun-Dullaeus für die interessante Fragestellung, die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens und die Hilfestellung während der Arbeit. Weiter möchte ich hier Dank für die kritische Begutachtung der Arbeit und die Betreuung, trotz örtlicher Distanz, anfügen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Daniel Sedding bedanken, der für mich stets ansprechbar war, mir ebenfalls in wissenschaftlichen Fragestellungen half, mich zusätzlich betreute und die Arbeit mehr als häufig kritisch begutachtete.

Herrn Harald Michnacs danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft während der Versuche, Herrn Dr. med. Diebold für die sachkundige Beratung auf dem Gebiet der Pathologie und Frau Tissy Wieth für die Hilfe bei der Zusammenfassung in wissenschaftlichem Englisch.

Dankbar bin ich auch allen Mitarbeitern des Labors der molekularen Kardiologie der Justus-Liebig Universität Gießen.

Selbstverständlich möchte ich auch meiner Familie und allen meinen Freunden danken, die mir den notwendigen sozialen Hintergrund gegeben haben, welcher notwendig war um diese Arbeit erfolgreich zu beenden.

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

